

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290978** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.09.01**

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/40** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.11.05**

---

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К СА IX И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(86) **PCT/IB2019/059492**

(87) **WO 2021/090046 2021.05.14**

(71) Заявитель:  
**МАБПРО А.С. (SK)**

(72) Изобретатель:

**Затовицова Мирьям, Пасторекова  
Силвия, Такацова Мартина,  
Баратгова Моника, Пасторек Яромир  
(SK)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к гуманизированному антителу, специфически распознающему СА IX человека, и к терапевтическим и диагностическим способам применения этого антитела. В частности, указанные способы относятся к лечению или диагностике раковых заболеваний, выбранных из сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рак головы и шеи.

**A1**

**202290978**

**202290978**

**A1**

## ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К СА IX И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, способным специфически связываться с карбоангидразой IX человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам к СА IX (карбоангидраза IX), содержащим определяющие комплементарность области мышиноного происхождения и гуманизированные тяжелые и легкие области.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

СА IX представляет собой карбоангидразу, связанную с раком, идентифицированную Zavada, Pastorekova, Pastorek (патент США 5387676) с помощью моноклонального антитела M75, впервые описанную Pastorekova et al, *Virology*, 187:620e626, 1992. Это антитело использовалось при клонировании кДНК (комплементарная ДНК) и гена, кодирующего СА IX, при оценке экспрессии СА IX в опухолях и нормальных тканях, при изучении регуляции СА IX и в исследованиях связи СА IX с прогрессированием рака и резистентностью к терапии. Все эти исследования подтвердили допущение, сделанное в первоначальном патенте США 5387676, что СА IX может применяться диагностически и/или прогностически в качестве предракового/неопластического опухолевого маркера и терапевтически в качестве мишени, и показали, что моноклональное антитело M75 является ценным реагентом, специфичным для СА IX, пригодным для различных способов иммунодетекции и имунотаргетных подходов.

СА IX (альтернативное название: белок MN (мембранный антиген)) относится к семейству карбоангидраз металлоферментов цинка, которые катализируют обратимую гидратацию диоксида углерода в бикарбонатные ионы и протоны. Существует 15 изоформ СА (карбоангидразы) человека, три из которых неактивны, а активность остальных двенадцати изменяется от слабой до очень сильной. Большинство изоферментов преимущественно экспрессируются в дифференцированных клетках для исполнения специализированных физиологических ролей в различных тканях и органах (Pastorekova et al, *J Enzyme Inhib Med Chem* 19, 199–229, 2004). СА IX имеет уникальное положение из-за ее сильной связи с раком, связанного с гипоксией профиля экспрессии, рКа-оптимума в кислой

области и дополнительного протеогликан-подобного домена (PG), исходящего из глобулярного каталитического домена фермента. Активный сайт фермента CA IX в каталитическом домене (CA) обращен во внеклеточное пространство и способствует регулированию pH через плазматическую мембрану. В настоящее время установлено, что CA IX взаимодействует с разнообразными агентами, осуществляющими выведение кислот, и импортерами бикарбонатов, включая натрий-зависимые транспортеры бикарбонатов NBCe1 и NBCn1 и лактат- и протон-экспортирующие транспортеры монокарбоксилатов MCT1 и MCT4. Участие CA IX в регуляции pH имеет множество последствий, поддерживающих фенотип опухоли. CA IX также ведет себя как молекула адгезии, которая способствует сборке и созреванию контактов фокальной адгезии во время присоединения клеток и распространения на твердой подложке. С другой стороны, CA IX может дестабилизировать контакты межклеточной адгезии за счет отсоединения E-кадгерина от крепления цитоскелета посредством конкурентного связывания с бета-катенином. Накопленные экспериментальные данные подтверждают, что CA IX функционально участвует в различных аспектах развития рака, включая защиту выживаемости раковых клеток в условиях гипоксии и ацидоза, облегчение миграции/инвазии раковых клеток, вклад в метастатическую диссеминацию, хоуминг и рост метастатических поражений.

CA IX является одним из лучших ответчиков на низкую оксигенацию (в диапазоне от аноксии до умеренной гипоксии), главным образом, из-за ее регуляции транскрипции с помощью индуцируемого гипоксией фактора HIF-1, связывающегося с консенсусной последовательностью отвечающего на гипоксию элемента (HRE), локализованной вблизи сайта инициации транскрипции (Wykoff et al, *Cancer Res* 60, 7075–7083, 2000). Инактивация белка-супрессора опухоли pVHL (Гиппеля-Линдау), который вызывает деградацию HIF, приводит к повышению экспрессии CA IX в опухолях почек (Ivanov et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12596-12601, 1998). Кроме того, гипоксия регулирует сплайсинг мРНК (матричная РНК) CA IX и опосредованное протеинкиназой А (PKA) фосфорилирование цитоплазматического хвоста белка CA IX, в обоих случаях влияющее на его ферментативную активность (Barathova et al, *Br J Cancer* 98, 129–136, 2008; Ditte et al, *Cancer Res* 71, 7558–7567, 2011).

CA IX может интернализироваться с поверхности клетки в цитоплазму клетки посредством эндоцитоза, индуцированного гипоксией и истощением кальция, а также специфическими антителами, связывающимися с его внеклеточной частью (Zatovicova et al, *Curr Pharm Des* 16, 3255–3263, 2010). Эктодомен CA IX может расщепляться металлопротеиназой ADAM17 и высвободиться в микроокружение в ответ на гипоксию,

ацидоз и токсические поражения ингибиторами карбоангидразы или химиотерапевтическими препаратами (Zatovicova et al, Br J Cancer 93, 1267-1276, 2005; Vidlickova et al, BMC Cancer 16, 239, 2016).

Экспрессия СА IX в нераковых тканях встречается редко и обычно ограничивается эпителием желудка, желчного пузыря, поджелудочной железы и кишечника.

Существует более 1000 исследований клинической ценности СА IX, предполагающих, что он может служить биомаркером и/или терапевтической мишенью при различных типах опухолей и состояниях (Pastorek and Pastorekova, Seminars in Cancer Biology 31, 52-64, 2015).

СА IX экспрессируется в высоком проценте клеток в более 90% случаев светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР), который несет инактивирующую мутацию/делецию гена супрессора опухоли VHL. Во многих других типах опухолей СА IX экспрессируется на региональном уровне в областях, которые являются гипоксическими и/или кислотными, и обычно увеличивается с повышением стадии и степени опухоли. Также СА IX может быть обнаружен в телесных жидкостях онкологических пациентов, что может быть использовано в клинических целях для неинвазивного скрининга или мониторинга онкологических пациентов.

Мета-анализ исследований, охватывающих более 24 тысяч пациентов с опухолями, отличными от ПКР (почечно-клеточного рака), выявил значительные связи между экспрессией СА IX, оцененной с помощью иммуногистохимии, и всеми конечными точками: общая выживаемость, выживаемость без признаков заболевания, местно-региональный контроль выживаемости, болезнь-специфическая выживаемость, выживаемость без метастазирования и выживаемость без прогрессирования заболевания (van Kuijk et al, Front Oncol 6, 69, 2016). Анализы подгрупп показали сходные связи в большинстве положений и типов опухолей. В заключение, эти результаты показывают, что пациенты, имеющие опухоли с высокой экспрессией СА IX, имеют более высокий риск прогрессирования заболевания и развития метастазов, независимо от типа опухоли или ее положения. Кроме того, существуют многочисленные исследования, демонстрирующие корреляцию между СА IX положительным статусом и устойчивостью к химиотерапии, лучевой терапии и даже иммунотерапиям, направленным на другие связанные с раком молекулярные мишени, такие как HER-2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) и PD-1 (белок запрограммированной клеточной смерти 1). Эти результаты подтверждают пригодность клинических тестов, определяющих прогноз пациента и результат терапии на основании экспрессии СА IX, и предоставляют обоснование

для разработки новых стратегий лечения, нацеленных на СА IX.

Стратегия нацеливания на СА IX, основанная на иммунотерапии, использует связанный с опухолью профиль экспрессии СА IX. В этом подходе используются моноклональные антитела (mAb) и, таким образом, обеспечивается высокая специфичность и селективность по отношению к СА IX, что в настоящее время не достижимо химическими соединениями. В случае антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) в качестве основного механизма действия, поражающее действие наступает быстро и не способствует развитию компенсаторных механизмов. Предыдущие клинические испытания с моноклональными антителами, специфическими к СА IX, не соответствовали первичной конечной точке из-за отсутствия стратификации пациентов (индуцирующая ответ ADCC GcG250, Willex) или из-за неприемлемой токсичности (конъюгат антитело-лекарственное средство MMAE-BAY79-4620, Bayer). Таким образом, предпочтительная стратегия иммунотерапии включает ADCC и стратификацию пациентов на основе уровня экспрессии СА IX.

Специфичность является важным фактором при принятии решений о том, может ли конкретное mAb успешно применяться при терапии рака. Это свойство достигается уникальным профилем экспрессии СА IX, связанного с опухолью, и, с другой стороны, только ограниченной экспрессии в нескольких нормальных тканях. Предыдущие клинические данные из исследований скПКР свидетельствуют о том, что иммунотерапия на основе антител, нацеленная на СА IX, безопасна и хорошо переносится (Chamie et al, JAMA Oncology 3:913-920, 2017). Кроме того, безопасность лечения связана с данными многочисленных исследований о том, что экспрессия СА IX тесно связана с фенотипом опухоли и ограничивается лишь несколькими нераковыми тканями, причем базальная мембрана не позволяет внутривенно вводимым антителам достигать эпителиальных клеток. Литературные данные по специфическому к СА IX химерному антителу cG250 (имеющему переменные области мышиного G250 и константные области, происходящие из IgG человека, также известного как RENCAREX® или GIRENTUXIMAB®) показали отсутствие III и IV степени, а также дозолимитирующей токсичности а, с другой стороны, превосходное накопление при ПКР и увеличение средней/общей выживаемости (Steffens et al, J Clin Oncol 15: 1529-1537, 1997; Davis et al, Cancer Immunity 7:14-23 2007; Bleumer et al, Br J Cancer 90: 985-990, 2004). Более того, комбинированная терапия cG250 с низкой дозой интерферона альфа была безопасной, хорошо переносилась и имела клинические преимущества для пациентов с прогрессирующим метастатическим ПКР (Siebels et al, World J Urol 29:121-126, 2011).

В WO2003/100029 раскрываются специфические к СА IX мышинные моноклональные антитела, полученные у мышей с дефицитом СА IX, с направленным нарушением гена Car9. Набор антител, продуцируемых специфическими клетками гибридомы, включает mAb VII/20 и mAb IV/18 (как описано в Zatovicova et al, J Immunol Methods 282, 117-134, 2003). mAb высокоселективны к СА IX и не вступают в перекрестные реакции с белками СА I, СА II и СА XII человека, которые экспрессируются в основном в нормальных дифференцированных тканях. Таким образом, ожидается, что оба моноклональных антитела будут обладать строго опухолеспецифическим действием.

Антитело VII/20 связывается с конформационным эпитопом в каталитическом (СА) домене СА IX, индуцирует интернализацию СА IX и демонстрирует мощный противоопухолевый эффект *in vivo* в мышинной модели с подкожными ксенотрансплантатами опухоли (Zatovicova et al, Curr Pharm Des 16, 3255–3263, 2010). Антитело IV/18 связывается с линейным эпитопом в протеогликан-подобном (PG) домене СА IX и не индуцирует интернализацию. Способность этих двух mAb различать антигенные области на двух отдельных внеклеточных доменах СА IX предоставляет возможность для эффективного нацеливания. Тот факт, что оба моноклональных антитела VII/20 и IV/18 были получены у мышей с дефицитом СА IX, которые больше не доступны и поэтому не могут быть получены снова, только подчеркивает их уникальность. Все ранее упомянутые свойства моноклональных антител дают основание для их гуманизации с целью их применения в противораковой иммунотерапии.

В данной области техники существует потребность в безопасных и эффективных антителах, которые нацелены на СА IX, для лечения связанных с СА IX состояний, таких как рак. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность и предлагает другие преимущества.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложено гуманизованное антитело, специфически распознающее СА IX человека, содержащее:

а) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

GFTFTDYMH (SEQ ID NO. 1) и

FIRNKASGYTPQYSASVKG (SEQ ID NO. 2) и

VRGGHAGSNYWYFDV (SEQ ID NO. 3), или

последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

GFTFNTNAMH (SEQ ID NO. 17) и

RIRSKSNNYTTYADSVKD (SEQ ID NO. 18) и

VCGSWFAY (SEQ ID NO. 19);

и

b) последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

HVSQNINWLS (SEQ ID NO. 9) и

QASNLHT (SEQ ID NO. 10) и

QQGQSYPT (SEQ ID NO. 11), или

последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

KSSQSLNSSNQKNYLA (SEQ ID NO. 25) и

FTSTRQS (SEQ ID NO. 26) и

QQHYSIPT (SEQ ID NO. 27).

В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело по настоящему изобретению содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные последовательностям GFTFTDYYMH (SEQ ID NO. 1) и FIRNKASGYTPQYSASVKG (SEQ ID NO. 2) и VRGGHAGSNYWYFDV (SEQ ID NO. 3) или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты: HVSQNINWLS (SEQ ID NO. 9) и QASNLHT (SEQ ID NO. 10) и QQGQSYPT (SEQ ID NO. 11).

В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело по настоящему изобретению содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные последовательностям GFTFNTNAMH

(SEQ ID NO. 17) и RIRSKSNNYTTYADSVKD (SEQ ID NO. 18) и VCGSWFAY (SEQ ID NO. 19) или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты: KSSQSLN<sup>25</sup>SSNQKN<sup>25</sup>YLA (SEQ ID NO. 25) и FTSTRQS (SEQ ID NO. 26) и QQHYSIPLT (SEQ ID NO. 27).

В одном аспекте гуманизованное антитело, специфически распознающее СА IX человека, по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну вариабельную область, выбранную из группы, состоящей из:

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательность:

X<sup>1</sup>VX<sup>2</sup>L<sup>3</sup>VX<sup>3</sup>SGGGLVQPGX<sup>4</sup>SLRLSCX<sup>5</sup>ASGFTFTDYMHVWRQAPGX<sup>6</sup>GLEWX<sup>7</sup>X<sup>8</sup>FIRNKA  
SGYTPQYSASVKGRFTISRDX<sup>9</sup>X<sup>10</sup>X<sup>11</sup>X<sup>12</sup>X<sup>13</sup>X<sup>14</sup>YLQMNSLX<sup>15</sup>X<sup>16</sup>EDTAX<sup>17</sup>YYVRGGHAGSN  
YWYFDVWGX<sup>18</sup>GTX<sup>19</sup>VTVSS (SEQ ID NO. 33),

где

X<sup>1</sup> представляет собой E или Q

X<sup>2</sup> представляет собой Q или R

X<sup>3</sup> представляет собой E или Q

X<sup>4</sup> представляет собой G или R

X<sup>5</sup> представляет собой A или T

X<sup>6</sup> представляет собой K или R

X<sup>7</sup> представляет собой V или L

X<sup>8</sup> представляет собой A или G

X<sup>9</sup> представляет собой D или N

X<sup>10</sup> представляет собой S или A

X<sup>11</sup> представляет собой K или T или E

X<sup>12</sup> представляет собой N или T

X<sup>13</sup> представляет собой S или I

X<sup>14</sup> представляет собой L или A

X<sup>15</sup> представляет собой K или R

X<sup>16</sup> представляет собой T или A или I

X<sup>17</sup> представляет собой V или I

X<sup>18</sup> представляет собой Q или K



X<sup>19</sup> представляет собой T или L или M; и

- вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательность:

DIQMTQSPSX<sup>20</sup>LSASVGDRVTIX<sup>21</sup>CHVSONINVWLSWYQQKPGX<sup>22</sup>APX<sup>23</sup>LLIYQASNLHT  
GVPSRFGSGSGTX<sup>24</sup>FTX<sup>25</sup>TIX<sup>26</sup>SLQPX<sup>27</sup>DX<sup>28</sup>X<sup>29</sup>TYYCQQGQSYPTFGX<sup>30</sup>GTKX<sup>31</sup>EIK

(SEQ ID NO. 34),

где

X<sup>20</sup> представляет собой S или T

X<sup>21</sup> представляет собой T или N

X<sup>22</sup> представляет собой K или N или E

X<sup>23</sup> представляет собой N или K

X<sup>24</sup> представляет собой H или E или D или G

X<sup>25</sup> представляет собой L или F

X<sup>26</sup> представляет собой S или G или R

X<sup>27</sup> представляет собой E или D

X<sup>28</sup> представляет собой I или F или Y

X<sup>29</sup> представляет собой A или V

X<sup>30</sup> представляет собой Q или G

X<sup>31</sup> представляет собой V или L; и

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей

последовательность:

X<sup>32</sup>VQLVESGGGX<sup>33</sup>VQPGX<sup>34</sup>SLX<sup>35</sup>LSCAASGFTFNTNAMHWVRQAX<sup>36</sup>GX<sup>37</sup>GLEWVX<sup>38</sup>RI  
RSKSNNYTTYADSVKDRFTISRDX<sup>39</sup>SKX<sup>40</sup>TX<sup>41</sup>YLQX<sup>42</sup>NSLX<sup>43</sup>X<sup>44</sup>EDTAVYYCVCGSWF

AYWGQGTGX<sup>45</sup>VTVSS (SEQ ID NO. 35),

где

X<sup>32</sup> представляет собой E или Q

X<sup>33</sup> представляет собой L или V

X<sup>34</sup> представляет собой G или R

X<sup>35</sup> представляет собой K или R

X<sup>36</sup> представляет собой S или P

X<sup>37</sup> представляет собой K или R

X<sup>38</sup> представляет собой A или G

X<sup>39</sup> представляет собой D или N

X<sup>40</sup> представляет собой N или S

X<sup>41</sup> представляет собой A или L

X<sup>42</sup> представляет собой M или V

X<sup>43</sup> представляет собой K или R

X<sup>44</sup> представляет собой T или A

X<sup>45</sup> представляет собой L или T; и

- вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательность:

DX<sup>46</sup>X<sup>47</sup>MTQSPDSLAVSLGERX<sup>48</sup>TINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWX<sup>49</sup>QQKPGQX<sup>50</sup>PX<sup>51</sup>X<sup>52</sup>X<sup>53</sup>IYFTSTRQSGVPDRFX<sup>54</sup>GSGSGTDFTLTIX<sup>55</sup>SLQAEDVAVYX<sup>56</sup>CQQHYSIPLTFGQGTX<sup>57</sup>X<sup>58</sup>EIK (SEQ ID NO. 36),

X<sup>46</sup> представляет собой V или I

X<sup>47</sup> представляет собой V или Q

X<sup>48</sup> представляет собой V или A

X<sup>49</sup> представляет собой Y или F

X<sup>50</sup> представляет собой S или P

X<sup>51</sup> представляет собой K или N

X<sup>52</sup> представляет собой L или V

X<sup>53</sup> представляет собой L или V

X<sup>54</sup> представляет собой S или T

X<sup>55</sup> представляет собой S или N

X<sup>56</sup> представляет собой Y или F

X<sup>57</sup> представляет собой K или Q

X<sup>58</sup> представляет собой L или V.

В предпочтительном варианте осуществления область тяжелой цепи, имеющая последовательность SEQ ID NO. 33, объединена с областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO. 34. В другом предпочтительном варианте осуществления область тяжелой цепи, имеющая последовательность SEQ ID NO. 35, объединена с областью легкой цепи, имеющей последовательность SEQ ID NO. 36.

В одном предпочтительном аспекте изобретения предложено гуманизованное антитело, специфически распознающее СА IX человека, содержащее по меньшей мере одну вариабельную область, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWRQAPGKGLEWVAFIRNKASGYT

PQYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKIEDTAVYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGQGT  
TVTVSS (SEQ ID NO. 4),  
EVRLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWLGFIRNKASGYTP  
QYSASVKGRFTISRDDSTNSLYLQMNSLKTEDTAIYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGQGT  
LTVTVSS (SEQ ID NO. 5),  
QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVGFFIRNKASGYT  
PQYSASVKGRFTISRDDSKTIAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGQGT  
LTVTVSS (SEQ ID NO. 6),  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGRGLEWVAFFIRNKASGYT  
PQYSASVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGKG  
TTTVTVSS (SEQ ID NO. 7) и  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVGFFIRNKASGYT  
PQYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGQGT  
MVTVTVSS (SEQ ID NO. 8);

b) аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHVSQNINWLSWYQQKPGKAPNLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTHFTLTISSLQPEDIAITYYCQQGQSYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO. 12),  
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCHVSQNINWLSWYQQKPGNAPKLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTEFTLTIGSLQPDDFVYYCQQGQSYPFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO. 13),  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHVSQNINWLSWYQQKPGEAPKLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQSYPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 14),  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCHVSNINWLSWYQQKPGEAPKLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTGFTLTIRSLQPEDYYYCQQGQSYPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 15) и  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHVSQNINWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTDFTFITISLQPEDIAITYYYCQQGQSYPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 16);

c) аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGTLLTVTVSS  
(SEQ ID NO. 20),  
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGTLLTVTVSS  
(SEQ ID NO. 21),

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGRGLEWVARIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDN SKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

(SEQ ID NO. 22),

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

(SEQ ID NO. 23) и

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO. 24); и

d) аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

DVVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFTSTRQ  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO.

28),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQKPGQPPNLVIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTQVEIK (SEQ ID NO.

29),

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO. 30),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQKPGQPPKVLIYFTSTRQS  
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 31)

и

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 32).

В предпочтительном варианте осуществления вариабельные области тяжелой цепи, перечисленные в а), объединяют с вариабельными областями легкой цепи, перечисленными в b), в одном антителе.

В другом предпочтительном варианте осуществления вариабельные области тяжелой цепи, перечисленные в с), объединяют с вариабельными областями легкой цепи, перечисленными в d), в одном антителе.

Предпочтительно гуманизированное антитело по настоящему изобретению содержит:

- аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 7, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15 и SEQ ID NO. 16;

или

- аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 22 и SEQ ID NO. 23, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 29 и SEQ ID NO. 32.

Согласно особо предпочтительному варианту осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению содержит:

- аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 7, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 15; или

- аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 23, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 32.

Предпочтительно гуманизированное антитело по настоящему изобретению имеет константные области тяжелых цепей IgG человека (аллотип G1m17,1) и константные области легких цепей каппа человека (аллотип Km3).

В настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированное антитело, как описано выше, которое специфически распознает СА IX человека, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Также в настоящем изобретении охватывается гуманизированное антитело или фармацевтическая композиция, как описано выше, предназначенное для применения при

лечении заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка СА IX. Такие заболевания и расстройства обычно включают клеточное пролиферативное заболевание или расстройство, такое как рак, выбранный из группы, состоящей из: сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рака головы и шеи.

Предпочтительно в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело или фармацевтическая композиция, как описано выше, предназначенное для применения при лечении рака молочной железы, мезотелиомы или глиобластомы, экспрессирующих СА IX.

При медицинском применении гуманизированных антител фармацевтических композиций может быть применено более одного гуманизированного антитела. Гуманизированные антитела или фармацевтические композиции, содержащие гуманизированные антитела, могут быть введены одновременно или последовательно. Предпочтительно их вводят последовательно.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка СА IX, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела или фармацевтической композиции, как описано выше. Такие заболевания и расстройства обычно включают клеточные пролиферативные заболевания или расстройства, такие как рак, выбранный из группы, состоящей из: сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака

предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рака головы и шеи.

Предпочтительно в настоящем изобретении предложен способ лечения рака молочной железы, мезотелиомы или глиобластомы, экспрессирующих СА IX, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела или фармацевтической композиции, как описано выше.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ снижения или ингибирования инвазивности опухоли у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела или фармацевтической композиции, как описано выше, тем самым снижая или ингибируя инвазивность опухоли у субъекта.

Соответствующая суточная или недельная доза гуманизованного антитела к СА IX для введения пациенту предпочтительно составляет 0,001-15 мг/кг массы тела.

Гуманизованное антитело к СА IX может вводиться по нескольким возможным схемам. Как правило, следующие схемы могут быть подходящими:

- i) многократные, идентичные или различные дозы гуманизованного антитела,
- ii) многократные возрастающие дозы гуманизованного антитела, или
- iii) введение дозы гуманизованного антитела один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в 5 недель.

В некоторых вариантах осуществления введение гуманизованного антитела к СА IX или фармацевтической композиции, как описано выше, включает 1-10 циклов введения, причем каждый цикл включает 2-5 инфузий/доз с гуманизованным антителом каждые 1-4 недели с последующим перерывом в 1-8 недель между каждыми двумя циклами.

В настоящем изобретении дополнительно предложена диагностическая композиция, содержащая по меньшей мере одно гуманизованное антитело, как описано выше в настоящем документе, и по меньшей мере один носитель, разбавитель или эксципиент.

Подходящие диагностические анализы, в которых применяется антитело по настоящему изобретению, включают иммунологические анализы, такие как ИФА (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – твердофазный иммуноферментный анализ), аффинная хроматография, иммуногистохимия и вестерн-блоттинг.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ диагностики рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий приведение в контакт биологического образца, происходящего из или полученного от указанного субъекта, с диагностической композицией, как описано в настоящем документе, при этом образование комплекса, превышающее заранее определенный порог, свидетельствует о наличии рака у указанного субъекта.

В диагностической композиции или в способе диагностики рака у субъекта гуманизированное антитело может быть соединено, связано или конъюгировано с парамагнитным, радиоактивным или флуорогенным фрагментом, который может быть обнаружен при визуализации.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1: Влияние мышиного моноклонального антитела IV/18 на образование метастазов в легком. (А) Общая эффективность источника излучения отражает количество раковых клеток HT1080-RFP в мышечных легких из либо контрольной группы, либо группы, обработанной mAb IV/18. (В) Репрезентативные изображения *ex vivo* флуоресцентных метастазов в легких контрольных мышей и мышей, получавших mAb IV/18.

Фигура 2: Реакционная способность двадцати пяти вариантов CA9hu-1 и CA9hu-2 с либо CA IX-положительным (C-33a\_CA IX), либо CA IX-отрицательным (C-33a\_neo) антигеном, определенная с помощью ИФА. Образцы, содержащие только разбавитель антитела, обозначены как «без Ab». В качестве эталонных образцов применяли родительские антитела VII/20 (А) или IV/18 (В) (обозначенные как «Ab мыши»), а также химерные антитела HC0LC0 (имеющие мышечные переменные домены и константные домены Ig человека). Данные на графике выражены в виде кратности изменения и рассчитаны как соотношение между значениями оптической плотности (O. D.) поглощения, измеренными при 492 нм, от CA IX-положительного антигена и значениями O. D. поглощения,



измеренными при 492 нм, от СА IX-отрицательного антигена.

Фигура 3: Скрининг 25 гуманизированных вариантов СА9hu-1 и СА9hu-2 на антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность с применением либо СА IX-положительных (С-33а\_СА IX), либо СА IX-отрицательных (С-33а\_neo) клеток. В качестве эталонных образцов применяли химерные антитела HC0LC0 (имеющие мышинные переменные домены и константные домены Ig человека). Данные на графике выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU) и представляют собой значения среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение.

Фигура 4: 3D (трёхмерная) модель сфероидов BT-20, культивируемых с МКПК (моноклеарные клетки периферической крови) человека, в присутствии гуманизированных вариантов антител СА9hu-1\_HC4LC4 и СА9hu-2\_HC4LC5. Проекция клеток МКПК в сфероидах BT-20 (и клетки МКПК, и сфероиды предварительно окрашены с помощью красителя CellBrite) из срезов по оси Z после 3 дней обработки, полученная по всему объёму сфероида (верхняя часть фигуры). Иммуногистохимический анализ влияния гуманизированных вариантов антител СА9hu-1\_HC4LC4 и СА9hu-2\_HC4LC5 на морфологию сфероидов. Типичные срезы сфероидов BT-20 совместно культивировали с МКПК и обрабатывали гуманизированными вариантами антител в течение 11 дней. В мембранах через сфероиды BT-20 наблюдалась характерная картина окрашивания СА IX (нижняя часть фигуры).

Фигура 5: Анализ многоклеточной агрегации С-33а\_СА IX с выбранными гуманизированными антителами (СА9hu-1\_HC4LC4 и СА9hu-2\_HC4LC5) через 24 ч и 72 ч на чашках, покрытых полигидроксиэтилметакрилатом (ПГЭМА). Клетки С-33а\_СА IX, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как «отрицательный контроль».

Фигура 6: Анализ клеток С-33а\_СА IX с помощью окрашивания йодидом пропидия и проточной цитометрии после 72 ч обработки выбранными гуманизированными антителами (СА9hu-1\_HC4LC4 и СА9hu-2\_HC4LC5). Клетки С-33а\_СА IX, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как «отрицательный контроль».

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Сокращения:

В подробном описании и примерах изобретения будут использоваться следующие сокращения:

3D	трёхмерный
ADCC	антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность
скПКР	светлоклеточный почечно-клеточный рак
CA IX	карбоангидраза IX
CDC	комплемент-зависимая цитотоксичность
CDR	определяющие комплементарность области
CRA	анализы высвобождения цитокинов
DOX	доксорубицин
ИФА	твёрдофазный иммуноферментный анализ
FCS	фетальная телячья сыворотка
FR	каркасная область
HER-2	рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа
HIF-1	фактор, индуцируемый гипоксией 1
HRE	отвечающий на гипоксию элемент
HVR	гипервариабельная область
IFN $\gamma$	интерферон $\gamma$
IL	интерлейкин
IMGT	информационная система по иммуногенетике
MNH	международные непатентованные наименования
кДа	килодальтон
K <sub>D</sub>	константа диссоциации
mAb	моноклональное антитело
M	молярный
MCT	транспортер монокарбоксилата
ГКГС	главный комплекс гистосовместимости
МКПК	моноклеарные клетки периферической крови
PBS	фосфатно-солевой буфер
ПЦР	полимеразная цепная реакция
PD-1	белок программируемой клеточной смерти 1
PD-L1	лиганд программируемой клеточной смерти 1
PG	протеогликан-подобная область
PKA	протеинкиназа A
PPA	анализ протеом Proteome Profiler Array
RFP	красный флуоресцентный белок

SEB	стафилококковый энтеротоксин В
ППР	поверхностный плазмонный резонанс
ТНPMЖ	трижды негативный рак молочной железы
TNF $\alpha$	фактор некроза опухоли $\alpha$
V <sub>H</sub>	вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина
V <sub>L</sub>	вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов
VHL	фон Гиппель-Ландау
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения

Клеточные линии:

8-MG-BA	раковые клетки глиобластомы человека (Cellosaurus CVCL_1052)
42-MG-BA	раковые клетки глиобластомы человека (Cellosaurus CVCL_1798)
BT-20	раковые клетки молочной железы человека (ATCC HTB-19)
C-33a	раковые клетки шейки матки человека (ATCC HTB-31)
LMТ-1	раковые клетки молочной железы человека (идентификатор базы данных HMS LINCS: 51118)
HT1080	раковые клетки фибросаркомы человека (ATCC CCL-121)

Определения:

Для лучшего понимания изобретения, ниже приведены конкретные определения некоторых технических и научных терминов. Если в настоящем документе не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют значения, обычно понятные специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Термин «СА IX» применяется для обозначения белкового продукта гена СА9 (например, NP\_001207.2).

Термины «анти-СА IX антитело», «антитело, которое распознает СА IX», «антитело против СА IX» и «антитело к СА IX» взаимозаменяемы и используются в контексте настоящего документа для обозначения антитела, которое связывается с белком СА IX (так, что антитело пригодно для применения в качестве диагностического и/или терапевтического

агента при нацеливании на СА IX).

Термин «антиген» в контексте настоящего документа относится к молекуле или фрагменту молекулы, способной вызывать образование антитела и быть связанной антителом. Антиген может иметь один или более одного эпитопа. Специфическая реакция призвана указывать, что антиген будет высокоселективно реагировать с соответствующим антителом, а не с множеством других антител, которые могут быть вызваны другими антигенами. Антиген по настоящему изобретению представляет собой белок СА IX или его фрагмент.

Термин «антигенная детерминанта» или «эпитоп» в контексте настоящего документа относится к области молекулы антигена, которая специфически реагирует с конкретным антителом. Пептидные последовательности, происходящие из эпитопа, могут применяться отдельно или в сочетании с фрагментом носителем, применяя способы, известные в данной области техники, для иммунизации животных и получения дополнительных или моноклональных антител. Выделенные пептиды, происходящие из эпитопа, могут применяться в диагностических способах для обнаружения антител и в качестве терапевтических агентов, когда требуется ингибирование указанных антител.

Термин «антитело» или «иммуноглобулин» в контексте настоящего документа относится к композиции из двух тяжелых цепей, соединенных между собой дисульфидными связями, и двух легких цепей, каждая из которых соединена с соответствующей тяжелой цепью дисульфидными связями в форме «Y». Протеолитическое расщепление антитела дает Fv (вариабельный фрагмент) и Fc (кристаллический фрагмент) домены. Антигенсвязывающие домены, Fab, включают области, в которых изменяется полипептидная последовательность. Термин F(ab')<sub>2</sub> представляет собой два плеча Fab', соединенных между собой дисульфидными связями. Центральная ось антитела называется Fc-фрагментом. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (V<sub>H</sub>), за которым следует ряд константных доменов (C<sub>H</sub>). Каждая легкая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (V<sub>L</sub>) и на другом её конце константный домен (C<sub>L</sub>), при этом вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи, а константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи. Вариабельные домены каждой пары легких и тяжелых цепей образуют антигенсвязывающий сайт. Домены легкой и тяжелой цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен содержит четыре

каркасные области, последовательности которых относительно консервативны, к которым присоединяются три гипервариабельных домена, известных как определяющие комплементарность области (CDR 1-3). Эти домены способствуют специфичности и аффинности антигенсвязывающего сайта. Изотип тяжелой цепи (гамма, альфа, дельта, эпсилон или мю) определяет класс иммуноглобулина (IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, соответственно). Легкая цепь представляет собой один из двух изотипов (каппа,  $\kappa$ , или лямбда,  $\lambda$ ), встречающихся во всех классах антител.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонента его природного окружения. В некоторых вариантах осуществления антитело очищается до более 95% или 99% чистоты, определяемой, например, с помощью электрофореза или хроматографии.

Термин «моноклональное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т. е. отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены против единственного антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат разные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты антигена.

Термин «химерное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, в котором фрагмент тяжелой и/или легкой цепи происходит из конкретного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника.

Термин «гуманизированное антитело» в контексте настоящего документа относится к антителу, содержащему аминокислотные остатки нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере один, а обычно два переменных домена, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют таковым участкам нечеловеческого антитела, и все или практически все FR

соответствуют таковым антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере фрагмент константной области антитела, происходящий из антитела человека. «Гуманизированная форма» антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

Термин «акцепторный каркас человека» для целей настоящего документа относится к каркасу, содержащему аминокислотную последовательность каркаса переменного домена тяжелой цепи ( $V_H$ ) или каркасу переменного домена легкой цепи ( $V_L$ ), происходящему из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, как определено ниже. Акцепторный каркас человека, «происходящий из» каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, может содержать совпадающую с ними аминокислотную последовательность или может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления последовательность акцепторного каркаса  $V_L$  человека идентична последовательности каркаса иммуноглобулина  $V_L$  человека или последовательности консенсусного каркаса человека.

Термин «гипервариабельная область» или «HVR» в контексте настоящего документа относится к каждой из областей переменного домена антитела, которая является гипервариабельной по последовательности и/или образует структурно определенные петли («гипервариабельные петли»). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR, три в  $V_H$  и три в  $V_L$ . HVR обычно содержат аминокислотные остатки гипервариабельных петель и/или «областей, определяющих комплементарность» (CDR), причем последние характеризуются самой высокой вариабельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигена.

В контексте настоящего документа термин «аффинность» относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между единственным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего документа «аффинность связывания» относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1 : 1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее

партнеру Y в целом может быть выражена константой диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в данной области техники, включая те, что описаны в настоящем документе.

Термин «эффекторная функция» в контексте настоящего документа относится к тем биологическим действиям, относящимся к Fc-области антитела, которые изменяются с классом антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

В контексте настоящего документа термин «Fc-область» относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере фрагмент константной области.

В контексте настоящего документа термин «эффективное количество» агента, например фармацевтического состава, относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

В контексте настоящего документа термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить эффективную биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в нем, и не содержит дополнительных компонентов, которые неприемлемо токсичны для субъекта, которому должен вводиться состав.

В контексте настоящего документа термин «лечение» относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение состояния индивидуума, подлежащего лечению, и может осуществляться либо для профилактики, либо в течение клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничиваются ими, предотвращение возникновения или возобновления заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитела по

изобретению применяют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

В контексте настоящего документа термин «субъект» или «индивидуум» относится к млекопитающему. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и нечеловекообразные приматы, например, обезьяны), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления субъект или индивидуум представляет собой человека.

В контексте настоящего документа термин «рак» и «раковый» относится к или описывает физиологическое состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают сквамозно-клеточную карциному, миелому, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, глиому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточный рак, рак яичников, рак печени, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, меланому, хондросаркому, нейробластому, рак поджелудочной железы, мультиформную глиобластому, рак шейки матки, рак головного мозга, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, мезотелиому и рак головы и шеи. Особенно предпочтительные раковые заболевания, которые можно лечить по настоящему изобретению, включают те заболевания, которые характеризуются повышенной экспрессией СА IX в тестируемых образцах тканей.

В контексте настоящего документа термин «противоопухолевая композиция» относится к композиции, пригодной для лечения рака, содержащей по меньшей мере один активный терапевтический агент, способный ингибировать или предотвращать рост или функцию опухоли и/или вызывать уничтожение опухолевых клеток. Терапевтические агенты, подходящие для противоопухолевой композиции для лечения рака, включают, но не ограничиваются ими, химиотерапевтические агенты, радиоактивные изотопы, токсины, цитокины, такие как интерфероны, и антагонистические агенты, нацеленные на цитокины,



цитокиновые рецепторы или антигены, связанные с опухолевыми клетками.

В контексте настоящего документа термин «диагностика» относится к определению наличия или отсутствия патологии, классификации патологии или симптома, определению тяжести патологии, мониторингу прогрессирования патологии, прогнозированию исхода патологии и/или перспектив выздоровления.

Применение терминов, относящихся к единственному числу, и подобных ссылок в контексте описания изобретения (особенно в контексте последующей формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее и единственное, и множественное число, если в данном документе не указано иное, или если это явно противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и «состоящий» следует толковать как неограничивающие термины (т. е. означающие «включая, но не ограничиваясь перечисленным»), если не указано иное. Перечисление диапазонов значений в настоящем документе предназначено исключительно для применения в качестве сокращенного способа ссылки по отдельности на каждое отдельное значение, входящее в диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно указано в данном документе.

Все описанные в настоящем документе способы могут быть осуществлены в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное, или это явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или иллюстративной формы (например, «такой как») в настоящем документе предназначено исключительно для лучшего разъяснения изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакую формулировку в описании не следует понимать как указывающую на какой-либо отсутствующий в формуле изобретения элемент, как на элемент, существенный для применения изобретения.

#### Фармацевтические составы

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит носитель антитела, желательно фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой любой подходящий фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего документа термин «фармацевтически

приемлемый носитель» означает один или более совместимых твердых или жидких наполнителей, разбавителей, других эксципиентов или инкапсулирующих веществ, которые подходят для введения человеку или пациенту-животному (например, физиологически приемлемый носитель или фармакологически приемлемый носитель). Термин «носитель» обозначает органический или неорганический ингредиент, природный или синтетический, с которым комбинируется активный ингредиент для облегчения применения. Фармацевтически приемлемый носитель может совместно смешиваться с одним или более активными компонентами, например гибридной молекулой, и друг с другом, когда в композиции присутствует более одного фармацевтически приемлемого носителя, таким образом, чтобы существенно не ухудшить желательную фармацевтическую эффективность. «Фармацевтически приемлемые» материалы, как правило, могут быть введены пациенту без возникновения значительных нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, головокружение, сыпь или расстройство желудка. Например, желательно, чтобы композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель, не была иммуногенной при введении пациенту-человеку в терапевтических целях.

Фармацевтическая композиция может содержать подходящие буферные агенты, например уксусную кислоту или ее соль, лимонную кислоту или ее соль, борную кислоту или ее соль и фосфорную кислоту или ее соль. Фармацевтические композиции также необязательно могут содержать подходящие консерванты, такие как хлорид бензалкония, хлорбутанол, парабены и тимеросал.

В настоящем документе состав также может содержать более одного активного соединения, необходимого для лечения конкретного показания, предпочтительно соединения с взаимодополняющими действиями, которые не оказывают негативного влияния друг на друга. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предусмотренной цели.

Композиция, подходящая для парентерального введения, для удобства включает стерильный водный препарат композиции по изобретению, который предпочтительно изотоничен крови реципиента. Этот водный препарат может быть составлен в соответствии с известными способами, в которых применяют подходящие диспергирующие или смачивающие агенты и суспендирующие агенты. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном

парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. В числе приемлемых носителей и растворителей, подходящих для применения, находятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, обычно в качестве растворителя или суспендирующей среды применяют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно применять любое мягкое нелетучее масло, такое как синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, для приготовления инъекций могут применяться жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Составы носителей, подходящие для перорального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и т. д. введений, могут быть найдены в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 22nd edition, 2013.

Составы для введения *in vivo* должны быть стерильными. Стерильности легко достичь путем фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

#### Диагностические применения антител к СА IX

В настоящем изобретении предложена диагностическая композиция, содержащая по меньшей мере одно гуманизованное антитело, которое специфически распознает СА IX человека, как описано выше.

В другом аспекте настоящего изобретения дополнительно предложен способ диагностики рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий приведение в контакт биологического образца, происходящего из или полученного у указанного субъекта, с диагностической композицией, описанной выше, при этом образование комплекса, превышающее заранее определенный порог, свидетельствует о наличии рака у указанного субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения дополнительно предложен способ определения экспрессии СА IX, включающий приведение в контакт биологического образца с его антителами, описанными выше, и измерение уровня образования иммунного комплекса.

В другом аспекте настоящего изобретения дополнительно предложен способ диагностики заболевания или расстройства, связанного с экспрессией белка СА IX,

включающий стадии инкубирования биологического образца с гуманизированным антителом, как описано выше, детектирования связанного белка СА IX с помощью детектируемого зонда, сравнения количества связанного белка СА IX со стандартной кривой, полученной из эталонных образцов, вычисления количества белка СА IX в биологическом образце по стандартной кривой и необязательно назначения пациенту соответствующего лечения.

В аспекте настоящего изобретения дополнительно предложено применение гуманизированных антител, как описано выше, для получения диагностической композиции для диагностики связанного с раком заболевания или расстройства.

В аспекте настоящего изобретения дополнительно предложена конъюгация антител по настоящему изобретению с синтетической молекулой. Синтетическая молекула может быть меткой. Метки могут быть пригодны для диагностических применений и могут включать, например, контрастные вещества. Контрастное вещество может представлять собой радиоизотопную метку, такую как йод ( $^{131}\text{I}$  или  $^{125}\text{I}$ ), индий ( $^{111}\text{In}$ ), технеций ( $^{99}\text{Tc}$ ), фосфор ( $^{32}\text{P}$ ), углерод ( $^{14}\text{C}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), другой радиоизотоп (например, радиоактивный ион) или терапевтический радиоизотоп, указанный выше. Кроме того, контрастные вещества могут включать рентгеноконтрастные материалы, агенты для магнитно-резонансной томографии (МРТ) и агенты для ультразвуковой томографии, а также любые другие контрастные вещества, подходящие для обнаружения устройством, которое получает изображение тела. Синтетическая молекула также может представлять собой флуоресцентную метку, биологически активную ферментную метку, люминесцентную метку или хромофорную метку.

#### Терапевтические применения антител к СА IX

Любое из антител к СА IX, предложенных в настоящем документе, может быть применено в терапевтических способах.

В одном аспекте предложено антитело к СА IX для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к СА IX для применения в способе лечения.

В дополнительном аспекте изобретения предложено применение антитела к СА IX при производстве или получении лекарственного средства.

В дополнительном аспекте изобретения предложен фармацевтический состав, содержащий любое из антител к СА IX, предложенных в настоящем документе. В одном варианте осуществления фармацевтический состав содержит любое из антител к СА IX, предложенных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Антитела по изобретению могут применяться при терапии либо по отдельности, либо в комбинации с другими агентами. Например, антитело по изобретению может быть введено совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом.

Такие вышеуказанные комбинированные терапии включают совместное введение (где два или более терапевтических агентов содержатся в одном и том же или отдельных составах) и раздельное введение, и в этом случае введение антитела по изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. Антитела по изобретению также можно применять в комбинации с лучевой терапией.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта, имеющего расстройство, связанное с повышенными уровнями СА IX. Как правило, указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества выделенного гуманизованного антитела по изобретению. Антитело может представлять собой любое антитело к СА IX по изобретению, как описано выше. Антитело может быть введено в комбинации с другими агентами, например цитотоксическим, цитостатическим, антиангиогенным, блокирующим иммунные контрольные точки агентом или терапевтическим радиоизотопом.

Антитело по изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент) может быть введено любыми подходящими способами, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное, и, при необходимости местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может быть осуществлено любым пригодным способом, например, с помощью инъекций, таких как внутривенные или

подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным. В настоящем документе предложены различные схемы дозирования, включая, но не ограничиваясь ими, единственное или многократное введения в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антитела по настоящему изобретению могут быть составлены, дозированы и введены в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в данном контексте, включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное молокопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные врачам-практикам. Антитело необязательно должно быть, но может быть составлено с одним или более агентами, применяемыми в настоящее время для предупреждения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, описанных выше. Они, как правило, применяются в той же дозировке и посредством тех же путей введения, как описано в настоящем документе, или в любой дозировке и посредством любого пути введения, которые эмпирически/клинически определены как подходящие.

Для лечения заболевания подходящая дозировка антитела по изобретению (при применении по отдельности или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело в превентивных или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и его ответа на антитело и усмотрения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту однократно или в ходе курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания первоначальная предполагаемая доза для введения пациенту, будь то, например, путем одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии, может составлять от около 0,001 мг/кг до 15 мг/кг антитела. При повторном введении в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно следует продолжать до желательного подавления симптомов заболевания. Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели. Может быть введена начальная повышенная нагрузочная доза, за которой следует одна или более пониженные дозы. Ход такой терапии можно легко контролировать с помощью обычных способов и

анализов.

## ПРИМЕРЫ

Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, приведены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Коммерчески доступные реагенты, указанные в примерах, применялись в соответствии с инструкциями производителя, если не указано иное.

### Пример 1: Гуманизированные антитела, происходящие из родительского mAb VII/20

Этот пример демонстрирует конструирование и характеристику гуманизированных вариантов антитела CA9hu-1.

В процессе гуманизации применяли комбинацию стандартных технологий прививки CDR в сочетании с последними исследованиями структуры антител и современной базой данных последовательностей зрелого IgG человека. Во-первых, были секвенированы переменные домены мышинового антитела VII/20. Определяющие комплементарность области (CDR) идентифицировали с помощью Информационной системы по иммуногенетике® (IMGT®) или системы нумерации по Кабату (Lefranc et al, Nucleic Acid Res 27:209-212, 1999; Lefranc et al, Dev Comp Immunol 27:55-77, 2003; Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991). Для оптимального сохранения конформации CDR-петля применяли обе системы нумерации для идентификации CDR в мышинных переменных тяжелых ( $V_H$ ), а также переменных легких ( $V_L$ ) доменах. Впоследствии был идентифицирован ряд каркасных последовательностей человека, которые применяли в качестве «акцепторных» каркасов (ниже в тексте) для последовательностей CDR. Каждый из доменов  $V_H$  синтезировали на каркасе с последовательностью константного домена изотипа IgG человека (аллотип G1m17,1). Кроме того, каждый из доменов  $V_L$  был синтезирован на каркасе с последовательностью константного домена изотипа IgK человека (аллотип Km3). Вся последовательность тяжелой и легкой цепи представляла собой кодон-оптимизированную последовательность, и была проверена последовательность ДНК.

Комбинация пяти  $V_H$  и пяти  $V_L$  цепей привела к образованию двадцати пяти гуманизированных вариантов, имеющих гуманизированные переменные домены [обозначенные в последующем тексте как тяжелые (HC) и легкие (LC) цепи] и константные домены Ig человека. Для того чтобы охарактеризовать двадцать пять гуманизированных вариантов антител, все последовательности были подвергнуты скринингу на наличие связывающих эпитопов II-го класса ГКГС, мотивов гликозилирования Fv и мотивов дезамидирования.

Мышиное моноклональное антитело VII/20 (изотип IgG2a), направленное на каталитический домен СА IX, получили у мышей с дефицитом СА IX (WO2003/100029; Zatovicova et al, J Immunol Methods 282, 117-134, 2003). При связывании с СА IX антитело VII/20 подвергается эффективной рецептор-опосредованной интернализации, приводящей к истощению молекул СА IX с клеточной поверхности раковых клеток (Zatovicova et al, Curr Pharm Des 16, 3255-3263, 2010). Биологические свойства mAb VII/20 и его способность вызывать противораковое действие оценивали на мышинной модели ксенотрансплантата колоректальной карциномы (Zatovicova et al, Curr Pharm Des 16, 3255-3263, 2010). Немедленное и отложенное лечение значительно уменьшало рост опухоли, что позволяло предположить, что иммунотерапия mAb VII/20 эффективна против колоректальных опухолевых клеток, и, таким образом, mAb VII/20 может служить инструментом для иммунотерапевтических способов. Кроме того, для определения захвата антитела в ксенотрансплантаты HT-29 антитело VII/20 метили Alexa Fluor-750 и визуализировали Kodak In-Vivo Imaging System FX на 720 exc (возбуждение) / 790 em (эмиссия) через 1 и 3 дня после внутривенной инъекции необработанным голым мышам с ксенотрансплантатами HT-29. Сигнал флуоресцентно-меченного mAb VII/20 накапливался в ксенотрансплантатах, что свидетельствовало о его поглощении в опухолевых клетках. Интересно, что антитело обнаруживалось внутри опухолей даже на 3-й день после его инъекции.

#### Тяжелая цепь

Мышиный домен  $V_H$  имел последовательность, представленную ниже, которая не включает мышиную сигнальную пептидную последовательность: EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYMHWVRQPPGMALEWLAFIRNKASGYTP  
QYSASVKGRFTISRQVDSQITILYQMNTLRPEDSATYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGAGTT  
VTVSS (SEQ ID NO. 37)



Остатки CDR (подчеркнуто) идентифицировали с помощью системы нумерации IMGT или системы нумерации по Кабату.

CDR1 VH VII/20 (SEQ ID NO. 1)

GFTFTDYMH

CDR2 VH VII/20 (SEQ ID NO. 2)

FIRNKASGYTPQYSASVKG

CDR3 VH VII/20 (SEQ ID NO. 3)

VRGGHAGSNYWFVDV

Онлайн базы данных последовательностей IgG человека проверяли для сравнения с мышинным доменом V<sub>H</sub> с применением алгоритмов поиска BLAST (средство поиска основного локального выравнивания), и из 200 лучших результатов BLAST были выбраны потенциальные переменные домены человека. Они были сокращены до пяти кандидатов (на основе комбинации каркасной гомологии, сохраняя ключевые каркасные остатки и каноническую петлевую структуру), и CDR были привиты.

Пять акцепторных каркасов представляют собой:

AGP01622 (SEQ ID NO. 41)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWVAHIRNQTHSYR  
TDYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKIEDTAVYYCTSPGITGSPGTAGISEYYDMDV  
WGQGTTVTVSS

AEX29728 (SEQ ID NO. 42)

EVRLESVGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWLGRIRKKLNSYTT  
QYATSVQGRFTISRDDSTNSLYLQMNSLKTEDTAIYYCARVSDGTWHLDYWGQGLVTVS  
S

CAA85550 (SEQ ID NO. 43)

QVQLVQSGGGLVQGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWVRQAPGKGLEWVGFIKSKAYGGT  
TEYAASVKGRFTISRDDSKTIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDYSSTVTPPFDYWGQGLV

TVSS

AMK70325 (SEQ ID NO. 44)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYEMNWVRQAPGRGLEWVAYISGNYNNIYY  
ADSVKGRFTISRDN AENSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVREGPTHYDIFYYYMDVWGKGT  
TVSS

IGHV3-72 (SEQ ID NO. 45)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKANSYT  
TEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDAFDVWGQGMVTVSS

Акцепторные каркасы, привитые CDR мышиных  $V_H$ , становятся гуманизированными вариантами:

HC1 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 4)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYYMHWVRQAPGKGLEWVAFIRNKASGY  
TPQYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKIEDTAVYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGQG  
TTVTVSS

HC2 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 5)

EVRLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYYMHWVRQAPGKGLEWLGFI  
RNKASGYTPQYSASVKGRFTISRDDSTNSLYLQMNSLKTEDTAIYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGQG  
TLVTVSS

HC3 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 6)

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVGFIRNKASGYT  
PQYSASVKGRFTISRDDSKTIAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGQGT  
LTVTVSS

HC4 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 7)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYYMHWVRQAPGRGLEWVAFIRNKASGY  
TPQYSASVKGRFTISRDN AENSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGGHAGSNYWFYFDVWGK  
GTTVTVSS

HC5 CA<sup>9</sup>hu-1 (SEQ ID NO. 8)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVGFIRNKASGYT  
PQYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRGGHAGSNYWYFDVWGQGT  
 MVTVSS

Таблица 1: Гомология гуманизированных вариантов по отношению к мышиной V<sub>H</sub> mAb VII/20. В порядке гомологии гуманизированные варианты расположены в ряду HC1 = HC4 > HC2 > HC5 > HC3.

	Идентичные аминокислоты	Консенсусные аминокислоты
HC1	87,1%	91,1%
HC2	86,3%	91,1%
HC3	83,1%	87,9%
HC4	87,1%	91,1%
HC5	85,5	90,3%

Легкая цепь

Мышиный домен V<sub>L</sub> имел последовательность, представленную ниже, которая не включает мышиную сигнальную пептидную последовательность:

DIQMNQSPSSLSASLGDTITIACHVSQNINVWLSWYQQKPGNIPKLLIYQASNLHTGVPSRF  
 TGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCQQGQSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO. 38)

Остатки CDR (подчеркнуто) идентифицировали с применением системы нумерации IMGT или системы нумерации по Кабату.

CDR1 VL VII/20 (SEQ ID NO. 9)

HVSQNINWLS

CDR2 VL VII/20 (SEQ ID NO. 10)

QASNLHT

CDR3 VL VII/20 (SEQ ID NO. 11)

QQGQSYPT

Онлайн базы данных последовательностей Ig каппа человека проверяли для сравнения с мышинным доменом  $V_L$  с применением алгоритмов поиска BLAST, и из 200 лучших результатов BLAST были выбраны потенциальные переменные домены человека. Они были сокращены до пяти кандидатов (на основе комбинации каркасной гомологии, сохраняя ключевые каркасные остатки и каноническую петлевую структуру), и CDR были привиты.

Пять акцепторных каркасов представляют собой:

APZ85307 (SEQ ID NO. 46)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGISRYLNWYQQKPGKAPNLLIYDASNLETGVPSRF  
SGSGSGTHFTLTISLQPEDATYYCQQYDNLPLTFGGGTKVEIK

AIT38562 (SEQ ID NO. 47)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGNAPKLLIYKASSLESGVPSRF  
SGSGSGTEFTLTIGSLQPDFVTYYCQQYNSFPYTFGQGTKVEIK

BAH04867 (SEQ ID NO. 48)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS  
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK

ANV21939 (SEQ ID NO. 49)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCRASQSINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQRGVPSRF  
SGSGSGTGFTLTIRSLQPEDYYATYYCQQSYRTPYSFGQGTKLEIK

IGKV1-33 (SEQ ID NO. 50)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF  
SGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYDNLPTFGQGTKLEIK

Для 3-й и 4-й акцепторных последовательностей некоторые остатки в каркасах были мутированы для оптимизации взаимодействий между заряженными остатками в тяжелой и легкой цепях. Акцепторные каркасы, привитые CDR мышинных  $V_L$ , становятся гуманизированными вариантами:

LC1 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHVSNINVWLSWYQQKPGKAPNLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTHFTLTISLQPEDATYYYCQQGQSYPTFGGGTKVEIK

LC2 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 13)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCHVSNINVWLSWYQQKPGNAPKLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTEFTLTIGSLQPDDEFVTTYCQQGQSYPTFGQGTKVEIK

LC3 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 14)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHVSNINVWLSWYQQKPGEAPKLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK

LC4 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 15)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCHVSNINVWLSWYQQKPGEAPKLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTGFTLTIRSLQPEDYYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK

LC5 CA9hu-1 (SEQ ID NO. 16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHVSNINVWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASNLHTGVPSR  
FSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK

Таблица 2: Гомология гуманизованных вариантов по отношению к мышинной V<sub>L</sub> mAb VII/20. В порядке гомологии гуманизованные варианты расположены в ряду LC3 = LC4 = LC5 > LC1 > LC2.

	Идентичные аминокислоты	Консенсусные аминокислоты
LC1	88,8%	92,5%
LC2	86,0%	91,6%
LC3	89,7 %	92,5%
LC4	89,7 %	92,5%
LC5	89,7 %	92,5%

#### Проверка гуманизации

Были проверены гуманизованные варианты, чтобы определить, были ли они гуманизованы в соответствии с определением гуманизованных антител Всемирной

организации здравоохранения (ВОЗ): Вариабельный домен гуманизированной цепи имеет аминокислотную последовательность V области, которая, анализируемая в целом, ближе к человеку, чем к другим видам (оценивали с помощью инструмента IMGT® DomainGapAlign) (Ehrenmann et al, Nucleic Acids Res 38, D301-307, 2010).

Таблица 3. Международные непатентованные наименования антител (МНН), присвоенные ВОЗ, для мышинных и гуманизированных вариантов. VH0/VL0 представляет собой мышиную последовательность VII/20, а HC1-5/LC1-5 представляет собой гуманизированные варианты.

Название последовательности	Виды	Гены и Аллели	Метка домена	%		Обозначение МНН по ВОЗ
				Идентичности	Перекрытие	
VH0	Mus musculus	IGHV7-3*02	VH	90,0	100	Мышиное
HC1	Homo sapiens	IGHV3-72*01	VH	87,0	100	Гуманизированное
HC2	Homo sapiens	IGHV3-72*01	VH	85,0	100	Гуманизированное
HC3	Homo sapiens	IGHV3-49*04	VH	87,0	100	Гуманизированное
HC4	Homo sapiens	IGHV3-72*01	VH	82,0	100	Гуманизированное
HC5	Homo sapiens	IGHV3-72*01	VH	89,0	100	Гуманизированное
VL0	Mus musculus	IGKV15-103*01	V-Каппа	85,0	86	Мышиное
LC1	Homo sapiens	IGKV1-33*01	V-Каппа	83,2	95	Гуманизированное
LC2	Homo sapiens	IGKV1-5*03	V-Каппа	84,0	94	Гуманизированное
LC3	Homo sapiens	IGKV1-12*01	V-Каппа	84,2	95	Гуманизированное
LC4	Homo sapiens	IGKV1-12*01	V-Каппа	80,0	95	Гуманизированное
LC5	Homo sapiens	IGKV1-33*01	V-Каппа	86,3	95	Гуманизированное

#### Скрининг Т-клеточного эпитопа

Презентация пептидных последовательностей в желобе молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) II класса приводит к активации CD4+ Т-клеток и иммуногенному ответу. Для того чтобы уменьшить этот ответ, терапевтические белки могут

быть сконструированы таким образом, чтобы избежать включения «Т-клеточных эпитопов», которые могут активировать Т-клетки путем снижения аффинности связывания с молекулами ГКГС II класса.

Исходные мышиные  $V_H$  и  $V_L$  антитела и последовательности гуманизированных вариантов подвергали скринингу на связывающие пептиды ГКГС II класса, чтобы определить, что в процессе гуманизации с помощью алгоритмов *in silico* были удалены пептидные последовательности с высокой аффинностью. Следующие 8 аллелей представляют более 99% мирового населения и являются стандартным набором аллелей, применяемым для прогнозирования эпитопов ГКГС II класса: DRB1\*01:01; DRB1\*03:01; DRB1\*04:01; DRB1\*07:01; DRB1\*08:02; DRB1\*11:01; DRB1\*13:02; DRB1\*15:01 (Nielsen et al, BMC Bioinformatics 8:238, 2007; Wang et al, BMC Bioinformatics 11:568, 2010; Gonzalez-Galarza et al, Nucleic Acid Research 39, D913-D919, 2011; Greenbaum et al, Immunogenetics 63(6): 325-35, 2011).

Для домена  $V_H$  гуманизированные варианты HC2, HC3 и HC5 были лучшими с точки зрения скрининга Т-клеточного эпитопа. Однако только по гомологии гуманизированные варианты HC1 и HC4 занимали более высокое место в выравнивании.

Для домена  $V_L$  гуманизированный вариант LC1 был признан лучшим по результатам скрининга Т-клеточного эпитопа. После выравнивания все гуманизированные варианты LC3, LC4 и LC5 оказались наиболее гомологичными мышью легкой цепи.

#### Скрининг посттрансляционных модификаций:

##### Гликозилирование Fv

Мотив N-гликозилирования представляет собой NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина. Этот мотив не присутствует в мышиных или гуманизированных вариантах  $V_H$  mAb VII/20. Мотив NQS присутствует в каркасной области 1 мышинового варианта LC0. Этот мотив был удален в процессе гуманизации и не присутствует ни в одном из гуманизированных вариантов легкой цепи.

##### Дезамидирование

Аминокислотные мотивы SNG, ENN, LNG и LNN могут быть склонны к дезаминированию аспарагинов в аспарагиновую кислоту (Chelius et al, Anal Chem 77(18): 6004-11, 2005). Аспарагин в других мотивах менее склонен к дезамидированию. Ни один из

этих четырех мотивов не присутствует в мышинных или гуманизированных вариантах, происходящих из  $V_H$  или  $V_L$  mAb VII/20.

Вышеприведенные данные демонстрируют получение двадцати пяти гуманизированных вариантов (обозначенные в последующем тексте как CA9hu-1<sub>HCxLCx</sub>), имеющих гуманизированные переменные домены и константные домены Ig человека.

#### Пример 2: Гуманизированные антитела, происходящие из mAb IV/18

Этот пример демонстрирует конструирование и характеристику вариантов гуманизированного антитела CA9hu-2.

В процессе гуманизации применяли комбинацию стандартных технологий прививки CDR в сочетании с последними исследованиями структуры антител и современной базой данных последовательностей зрелого IgG человека. Во-первых, были секвенированы переменные домены мышинного антитела VII/20. Определяющие комплементарность области (CDR) идентифицировали с помощью Информационной системы по иммуногенетике® (IMGT®) или системы нумерации по Кабату. Для оптимального сохранения конформации CDR-петля применяли обе системы нумерации для идентификации CDR в мышинных переменных тяжелых ( $V_H$ ), а также переменных легких ( $V_L$ ) доменах. Впоследствии был идентифицирован ряд каркасных последовательностей человека, которые применяли в качестве «акцепторных» каркасов (ниже в тексте) для последовательностей CDR. Каждый из доменов  $V_H$  синтезировали на каркасе с последовательностью константного домена изотипа IgG человека (аллотип G1m17,1). Кроме того, каждый из доменов  $V_L$  был синтезирован на каркасе с последовательностью константного домена изотипа IgK человека (аллотип Km3). Вся последовательность тяжелой и легкой цепи представляла собой кодон-оптимизированную последовательность, и была проверена последовательность ДНК.

Комбинация пяти  $V_H$  и пяти  $V_L$  цепей привела к образованию двадцати пяти гуманизированных вариантов, имеющих гуманизированные переменные домены [обозначенные в последующем тексте как тяжелые (HC) и легкие (LC) цепи] и константные домены Ig человека. Для того чтобы охарактеризовать двадцать пять гуманизированных вариантов антител, все последовательности были подвергнуты скринингу на наличие связывающих эпитопов ГКГС II-го класса, мотивов гликозилирования Fv и мотивов



дезамидирования.

Мышиное моноклональное антитело IV/18 (изотип IgG2a), направленное на протеогликан-подобный (PG) домен CA IX, получили у мышей с дефицитом CA IX (WO2003/100029; Zatovicova et al, J Immunol Methods 282, 117-134, 2003). Предварительная инкубация гипоксических опухолевых клеток с mAb IV/18 уменьшила количество метастазов в легких в мышинной модели колонизации легких (Фигура 1А). Метастатические колонии флуоресцентно-меченных HT1080-красным флуоресцентным белком (RFP) клеток в перфузированных PBS мышинных легких визуализировали ex vivo через 12 дней с помощью системы визуализации IVIS Caliper (Фигура 1В). Общая эффективность источника излучения отражает количество раковых клеток в мышинных легких. Предварительная инкубация клеток HT1080-RFP с mAb IV/18 и последующее введение трех доз антитела (50 мкг/мышь) в течение 12 дней после первичной инъекции в хвостовую вену (1 500 000 клеток/мышь, 10 мышей в группе) привели к заметному снижению колонизации легких этими клетками, что определили по сигналу флуоресценции с помощью IVIS. Метастатические колонии оценивали вскоре после инокуляции хвостовой вены, что означает, что снижение экстравазации было основным фактором, обуславливающим снижение образования метастазов. Эти данные указывают на возможную пользу терапии, направленной на CA IX, в ослаблении экстравазации опухолевых клеток и образовании метастазов.

Тяжелая цепь

Мышиный домен V<sub>H</sub> имел последовательность, представленную ниже, которая не включает мышиную сигнальную пептидную последовательность:

EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYT  
TTYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVCGSWFAYWGQGLTVVSA  
(SEQ ID NO. 39)

Остатки CDR (подчеркнуто) идентифицировали с помощью системы нумерации IMGT или системы нумерации по Кабату.

CDR1 VH IV/18 (SEQ ID NO. 17)

GFTFNTNAMH

CDR2 VH IV/18 (SEQ ID NO. 18)

RIRSKSNNYTTYADSVKD

CDR3 VH IV/18 (SEQ ID NO. 19)

VCGSWFAY

Онлайн базы данных последовательностей IgG человека проверяли для сравнения с мышиным доменом V<sub>H</sub> с применением алгоритмов поиска BLAST, и из 200 лучших результатов BLAST были выбраны потенциальные вариабельные домены человека. Они были сокращены до пяти кандидатов (на основе комбинации каркасной гомологии, сохраняя ключевые каркасные остатки и каноническую петлевую структуру), и CDR были привиты.

Пять акцепторных каркасов представляют собой:

AGP01286 (SEQ ID NO. 51)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKANSYA  
TAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRLVGAIPFDYWGQGLTVTS  
S

AEX29087 (SEQ ID NO. 52)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFSGPAIHWVRQASGKGLEWVGRIRSKAKNFAT  
AYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTSSSINDYWGQGLTVTVSS

ACS95862 (SEQ ID NO. 53)

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGRGLEWVAFIRSDGSNTY  
YSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAFGGDYYFGYWGQGLTVTVSS

BAC01516 (SEQ ID NO. 54)

EVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKY  
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRTGDYWGQGLTVTVSS

IGHV3-73 (SEQ ID NO. 55)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKANSYA  
TAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCYTRYYGMDVWGQGTTVTVSS

Акцепторные каркасы, привитые CDR мышиных  $V_H$ , становятся гуманизированными вариантами:

HC1 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 20)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

HC2 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 21)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

HC3 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 22)

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGRGLEWVARIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

HC4 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 23)

EVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

HC5 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 24)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

Таблица 4: Гомология гуманизированных вариантов по отношению к мышиной  $V_H$  mAb IV/18. В порядке гомологии гуманизированные варианты расположены в ряду HC2 > HC1 > HC5 > HC4 > HC3.

	Идентичные аминокислоты	Консенсусные аминокислоты
HC1	90,6%	94,0%
HC2	91,5%	94,9%
HC3	86,3%	93,2%
HC4	88,0%	93,2%
HC5	89,7 %	93,2%

## Легкая цепь

Мышиный домен  $V_L$  имел последовательность, представленную ниже, которая не включает мышиную сигнальную пептидную последовательность:

DIVMTQSPSSLAMSLGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQKPGQSPKLLVYFTSTR  
QSGVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO.  
40)

Остатки CDR (подчеркнуто) идентифицировали с помощью системы нумерации IMGT или системы нумерации по Кабату.

CDR1 VL IV/18 (SEQ ID NO. 25)

KSSQSLLNSSNQKNYLA

CDR2 VL IV/18 (SEQ ID NO. 26)

FTSTRQS

CDR3 VL IV/18 (SEQ ID NO. 27)

QQHYSIPLT

Онлайн базы данных последовательностей Ig каппа человека проверяли для сравнения с мышиным доменом  $V_L$  с применением алгоритмов поиска BLAST, и из 200 лучших результатов BLAST были выбраны потенциальные вариabельные домены человека. Они были сокращены до пяти кандидатов (на основе комбинации каркасной гомологии, сохраняя ключевые каркасные остатки и каноническую петлевую структуру), и CDR были привиты.

Пять акцепторных каркасов представляют собой:

AAW69164 (SEQ ID NO. 56)

DVVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSVLNSTNNKNYLVWYQQKPGQSPKLLIYLASTRE  
EGVPDRFSGSGSGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQYHSSPHTFGGQGTKLEIK

CAI99839 (SEQ ID NO. 57)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYNSNNKNYLAWFQKPGQPPNLVIYWASTRE

SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCLQYYSTPLTFGQGTQVEIK

AMK70392 (SEQ ID NO. 58)

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVLYSSKNKNYLAWFQQKPGQPKLLIYRASTRDS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQYYSTPQTFGQGTKVEIK

ALV87854 (SEQ ID NO. 59)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYRSKNKNYLAWFQQKPGQPPKVLIYSTSTRA  
SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYYCLQYYITPYTFGQGTKLEIK

IGKV4-1 (SEQ ID NO. 60)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLAWFQQKPGQPPKLLIYWASTRE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK

Акцепторные каркасы, привитые CDR мышинных V<sub>L</sub>, становятся гуманизированными вариантами:

LC1 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 28)

DVVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLNSSNQNKNYLAWFQQKPGQSPKLLIYFTSTRQ  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK

LC2 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 29)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSSNQNKNYLAWFQQKPGQPPNLVIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTQVEIK

LC3 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 30)

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSSNQNKNYLAWFQQKPGQPPKLLIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTKVEIK

LC4 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 31)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSSNQNKNYLAWFQQKPGQPPKVLIYFTSTRQS  
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK

LC5 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 32)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK

Таблица 5: Гомология гуманизованных вариантов по отношению к мышинной V<sub>L</sub> mAb IV/18. В порядке гомологии гуманизованные варианты расположены в ряду LC1 > LC4 = LC5 > LC3 > LC2.

	Идентичные аминокислоты	Консенсусные аминокислоты
LC1	85,8%	94,7%
LC2	82,3%	90,3%
LC3	84,1%	92,0%
LC4	85,0%	92,9%
LC5	85,0%	92,9%

#### Проверка гуманизации

Были проверены гуманизованные варианты, чтобы определить, были ли они гуманизованы в соответствии с определением гуманизованных антител Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ): Варибельный домен гуманизованной цепи имеет аминокислотную последовательность V области, которая, анализируемая в целом, ближе к человеку, чем к другим видам.

Таблица 6. МНН антител, присвоенные ВОЗ, для мышинных и гуманизованных вариантов. VH0/VL0 представляет собой мышиную последовательность IV/18, а HC1-5/LC1-5 представляет собой гуманизованные варианты.

Название последова тельности	Виды	Гены и Аллели	Метка домен	% Идентич ности	Перекр ытие	Обозначение МНН по ВОЗ
VH0	Mus musculus	IGHV10S3*01	VH	98,0	99	Мышиное
HC1	Homo sapiens	IGHV3-73*01	VH	90,8	98	Гуманизованное
HC2	Homo sapiens	IGHV3-73*01	VH	89,8	98	Гуманизованное
HC3	Homo sapiens	IGHV3-30*02	VH	84,7	98	Гуманизованное
HC4	Homo sapiens	IGHV3-30*01	VH	85,7	98	Гуманизованное
HC5	Homo sapiens	IGHV3-73*01	VH	90,8	98	Гуманизованное
VL0	Mus musculus	IGKV8-24*01	V- Каппа	95,0	101	Мышиное

LC1	Homo sapiens	IGKV4-1*01	V- Каппа	89,1	101	Гуманизированное
LC2	Homo sapiens	IGKV4-1*01	V- Каппа	87,1	101	Гуманизированное
LC3	Homo sapiens	IGKV4-1*01	V- Каппа	90,1	101	Гуманизированное
LC4	Homo sapiens	IGKV4-1*01	V- Каппа	89,1	101	Гуманизированное
LC5	Homo sapiens	IGKV4-1*01	V- Каппа	92,1	101	Гуманизированное

### Скрининг Т-клеточного эпитопа

Презентация пептидных последовательностей в желобе молекул ГКГС II класса приводит к активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток и иммуногенному ответу. Для того чтобы уменьшить этот ответ, терапевтические белки могут быть сконструированы таким образом, чтобы избежать включения «Т-клеточных эпитопов», которые могут активировать Т-клетки путем снижения аффинности связывания с молекулами ГКГС II класса.

Исходные мышинные V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> антитела и последовательности гуманизированных вариантов подвергали скринингу на связывающие пептиды ГКГС II класса, чтобы определить, что в процессе гуманизации с помощью алгоритмов *in silico* были удалены пептидные последовательности с высокой аффинностью. Следующие 8 аллелей представляют более 99% мирового населения и являются стандартным набором аллелей, применяемым для прогнозирования эпитопов ГКГС II класса: DRB1\*01:01; DRB1\*03:01; DRB1\*04:01; DRB1\*07:01; DRB1\*08:02; DRB1\*11:01; DRB1\*13:02; DRB1\*15:01.

Для домена V<sub>H</sub> все гуманизированные варианты показали хорошие результаты с точки зрения скрининга Т-клеточного эпитопа, при этом HC3, согласно прогнозам, имеет наименьший Т-клеточный эпитоп зародышевой линии. С помощью анализа только по гомологии оценили HC2 и HC1 как наиболее близкие к мышинной родительской последовательности.

Для домена V<sub>L</sub> все гуманизированные варианты в ходе скрининга Т-клеточного эпитопа были оценены одинаково. Только по гомологии LC1 и LC4 были оценены как самые высокие.

### Скрининг посттрансляционных модификаций:

#### Гликозилирование Fv

Мотив N-гликозилирования представляет собой NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина. Этот мотив NYT присутствует в мышинном варианте V<sub>H</sub> CDR2 и, поскольку CDR были привиты в полном объеме, был перенесен во все гуманизированные варианты.

Мотив NSS присутствует в мышинной CDR1 легкой цепи. Этот мотив также был перенесен во все гуманизированные варианты.

#### Дезамидирование

Аминокислотные мотивы SNG, ENN, LNG и LNN могут быть склонны к дезаминированию аспарагинов в аспарагиновую кислоту. Аспарагин в других мотивах менее склонен к дезамидированию. Ни один из этих четырех мотивов не присутствует в мышинных или гуманизированных вариантах V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> mAb IV/18.

Вышеприведенные данные демонстрируют получение двадцати пяти гуманизированных вариантов (обозначенных в последующем тексте как CA9hu-2\_НСхLCх), имеющих гуманизированные переменные домены и константные домены Ig человека.

### Пример 3: Характеристика связывающей способности гуманизированных антител

Этот пример демонстрирует желательные свойства связывания двадцати пяти гуманизированных вариантов CA9hu-1 и двадцати пяти гуманизированных вариантов CA9hu-2 для карбоангидразы IX. Антигенсвязывающую специфичность и аффинность определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) и поверхностного плазмонного резонанса (ППР), соответственно.

#### ИФА

Для оценки антигенсвязывающей специфичности все двадцать пять гуманизированных вариантов CA9hu-1 и CA9hu-2 подвергли ИФА с применением либо CA IX-положительного, либо CA IX-отрицательного антигена. Антигены получали из стабильно



трансфицированной клеточной линии С-33а, экспрессирующей СА IX (С-33а\_СА IX), и родительских ложно-трансфицированных клеток С-33а без экспрессии СА IX (С-33а\_neo).

Белки экстрагировали из клеточного монослоя лизирующим буфером RIPA (0,1% дезоксихолат, 1% Тритон X-100 и коктейль ингибиторов протеазы в PBS). Концентрации белка определяли с помощью анализа бицинхониновой кислоты (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Белковые экстракты разбавляли до конечной концентрации 0,2 мг/мл в PBS. Концентрация белка в образцах антигена, применяемых при скрининге специфического взаимодействия антиген-антитело, протестированного с помощью ИФА, соответствует требованиям к низкому содержанию детергента, которое в противном случае могло бы помешать анализу. 50 мкл либо СА IX-положительного, либо СА IX-отрицательного антигена наносили на поверхность лунок планшета в течение ночи при 37 °С. После промывки PBS-T 0,05% Tween-20 в PBS при pH 7,2, добавляли 50 мкл всех гуманизированных вариантов СА9hu-1 и СА9hu-2 (разбавленных до концентрации 5 мкг/мл в 10% FCS в PBS-T) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. В качестве детектора применяли меченное пероксидазой антитело свиньи к IgG человека (разбавленное 1 : 5000 в 10% FCS в PBS-T; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США). В качестве эталонных образцов применяли родительские антитела VII/20 или IV/18 (обозначенные как «Ab мыши»), а также химерные антитела HC0LC0 (имеющие мышинные переменные домены и константные домены Ig человека). Данные на графике выражены как кратность изменения и рассчитаны как соотношение между значениями оптической плотности (O. D.) поглощения, измеренными при 492 нм, от СА IX-положительного антигена и значениями O. D. поглощения, измеренными при 492 нм, от СА IX-отрицательного антигена.

На Фигуре 2 продемонстрировано специфическое и эффективное связывание двадцати пяти гуманизированных вариантов антител к СА IX. Из набора гуманизированных антител СА9hu-1 все пять вариантов HC4 обладали очень высокой эффективностью связывания против СА IX. Значительно более высокая эффективность связывания наблюдалась в случае большинства гуманизированных вариантов СА9hu-2 (Фигура 2).

Таким образом, авторы изобретения сконструировали гуманизированное антитело, которое специфически связывает свой антиген.

## ППР

Для того чтобы определить антигенсвязывающую аффинность гуманизованных вариантов, измерения константы аффинности ( $K_D$ ) для антител, связывающихся с СА IX, осуществляли посредством ППР с применением прибора Biacore 2000 (T200 в случае СА9hu-2) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, США). Каждый вариант гуманизованного антитела был зафиксирован на сенсорном чипе CM5, а рекомбинантный белок СА IX человека (rh СА IX; 42 кДа; R&D Systems, Inc., Minneapolis MN, США) в качестве антигена добавлялся в буфер, протекающий по чипу. Детали настройки количественного анализа взаимодействия между гуманизованными антителами и rh СА IX были следующими: скорость потока 30 мкл/мин, температура анализа 25 °С, буфер для анализа (10 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 нМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 0,05% Tween 20). Результаты анализа ППР выражены в виде равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ) (таблица 7).

Таблица 7: Данные анализа ППР двадцати пяти вариантов СА9hu-1 и СА9hu-2, выраженных в виде значений  $K_D$ . В качестве эталонных образцов применяли химерные антитела HC0LC0 (имеющие мышинные вариабельные домены и константные домены Ig человека).

	CA9hu-1	CA9hu-2
	$K_D$ (M)	$K_D$ (M)
HC1LC1	9,70E-08	4,40E-08
HC1LC2	8,00E-08	5,61E-08
HC1LC3	9,60E-08	7,05E-08
HC1LC4	1,00E-07	7,49E-08
HC1LC5	9,60E-08	7,13E-08
HC2LC1	6,00E-08	5,39E-08
HC2LC2	5,30E-08	8,77E-08
HC2LC3	5,10E-08	9,83E-08
HC2LC4	6,00E-08	6,01E-08
HC2LC5	5,60E-08	6,05E-08
HC3LC1	9,10E-08	3,74E-08
HC3LC2	8,10E-08	4,01E-08
HC3LC3	8,20E-08	6,23E-08

HC3LC4	9,70E-08	7,31E-08
HC3LC5	8,30E-08	5,43E-08
HC4LC1	1,52E-08	3,96E-08
HC4LC2	9,10E-09	3,27E-08
HC4LC3	1,07E-08	4,42E-08
HC4LC4	1,52E-08	7,46E-08
HC4LC5	1,23E-08	4,19E-08
HC5LC1	не обнаружено	6,98E-08
HC5LC2	5,20E-08	1,05E-07
HC5LC3	5,60E-08	5,72E-08
HC5LC4	5,40E-08	4,73E-08
HC5LC5	6,40E-08	6,51E-08
HC0LC0	2,20E-08	1,31E-08

Анализ ППР позволил авторам изобретения проверить все двадцать пять гуманизированных вариантов антител путем мониторинга кинетики их связывания с рекомбинантным белком СА IX человека в режиме реального времени. Чем меньше значения  $K_D$ , тем больше аффинность связывания анализируемого антитела. Как показано в таблице 7, все варианты антител имеют значения  $K_D$  в низком наномолярном диапазоне ( $10^{-7}$  -  $10^{-9}$ ), который обычно считается диапазоном высокоаффинных антител. Более того, некоторые варианты антител из СА9hu-1 (HC4LC1, HC4LC2, HC4LC3, HC4LC4 и HC4LC5) показали даже более высокую аффинность, чем химерный вариант.

Согласно результатам, полученным с помощью ИФА и анализа ППР, следующие варианты антител с наивысшей аффинностью к СА IX были выбраны из СА9hu-1: HC4LC1, HC4LC2, HC4LC3, HC4LC4 и HC4LC5, и из СА9hu-2: HC3LC1, HC3LC2, HC4LC1, HC4LC2 и HC4LC5.

Вышеприведенные результаты демонстрируют, что гуманизированные варианты антител СА9hu-1 и СА9hu-2 сохраняют желательную специфичность и аффинность к их антигену и могут быть применены для специфического разделения опухолевых клеток, экспрессирующих СА IX.

Пример 4: Влияния ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная

цитотоксичность) и CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность) гуманизированных антител

Этот пример демонстрирует желательное участие гуманизированных вариантов антител к СА IX в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

#### ADCC

Для оценки способности гуманизированных вариантов антител опосредовать цитотоксический эффект применяли ADCC Reporter Bioassay System (Promega, Madison WI, USA). ADCC Reporter Bioassay System представляет собой биолюминесцентный репортерный анализ для количественной оценки биологической активности по активации путей терапевтическими лекарственными средствами антител в механизме действия ADCC (Chung et al., *Monoclonal Antibodies* 4:326–40, 2012). В нем применяются сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa, высокоаффинный вариант V158 и отвечающий элемент NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток), управляющий экспрессией люциферазы светлячков в качестве эффекторных клеток. Таким образом, механизм действия ADCC количественно определяется посредством получения люциферазы в результате активации NFAT.

Репортерный анализ ADCC проводили в соответствии с инструкциями производителя с применением C-33a\_CA IX, а также C-33a\_нео клеток. Оба типа клеток (12 500 клеток/лунку) высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37 °С. Гуманизированные варианты антител (CA9hu-1 или CA9hu-2) разбавляли до 1 мкг/мл в PBS и применяли 75 000 эффекторных клеток (в соответствии с рекомендуемым соотношением эффектор : мишень, равным 6 : 1) на лунку. После 6 ч инкубации проводили детектирование люциферазы светлячков с помощью реагента для анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega). Смесь образца с буфером для анализа ADCC и эффекторными клетками без добавления гуманизированного антитела обозначали как «без Ab». Смесь образца без антитела и эффекторных клеток обозначали как «без Ab, без ЕС» и она служит в качестве «фона планшета». Результаты выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU) и рассчитаны как кратность изменения (соотношение между RLU, индуцированная вариантом гуманизированного антитела и RLU без Ab).

Как показано на Фигуре 3, варианты CA9hu-1 демонстрировали высокий сигнал люминесценции и, таким образом, высокую цитотоксичность против клеточной линии C-33a, экспрессирующей CA IX. В связи с тем, что RLU образцов были в 100 раз выше, чем RLU фона планшета (обозначенные как «без Ab, без клеток EC»), не было необходимости вычитать фон планшета из RLU образца. Хотя варианты CA9hu-2 оказались менее эффективными, чем антитела CA9hu-1, они все равно обладают в два раза большей способностью активировать цитотоксический путь через ADCC против клеток C-33a, экспрессирующих CA IX, чем клетки C-33a\_neo (Фигура 3).

Оценка эффекторных функций гуманизованных вариантов антител по изобретению (через репортерный анализ ADCC), а также их антигенсвязывающей активности и специфичности (с помощью ППР и ИФА) привела к выбору следующих вариантов антител в качестве потенциальных кандидатов: CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5.

Чтобы доказать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность на раковой клетке, естественным образом экспрессирующей CA IX, авторы настоящего изобретения проанализировали клеточные линии трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) BT-20 и JMT-1, а также клеточные линии глиобластомы 8-MG-BA и 42-MG-BA. За 24 ч до анализа линии раковых клеток (за исключением клеток JMT-1, которые инкубировали 48 ч) предварительно инкубировали в условиях гипоксии для обеспечения самой высокой экспрессии CA IX. После предварительной инкубации в условиях гипоксии 12 500 клеток/лунку высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37 °C. Аналогично, как и в случае скрининга ADCC, репортерный анализ ADCC проводили в соответствии с инструкциями производителя. Гуманизованные варианты антител разбавляли до 1 мкг/мл в PBS и применяли 75 000 эффекторных клеток (в соответствии с рекомендуемым соотношением эффектор : мишень, равным 6 : 1) на лунку. После 6 ч инкубации проводили детектирование люциферазы светлячков с помощью реагента для анализа люциферазы Bio-Glo™.

Таблица 8: Сравнение данных ADCC с применением выбранных гуманизованных антител (CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5) на двух различных клеточных линиях рака глиобластомы (8-MG-BA и 42-MG-BA) и молочной железы (BT-20 и JMT-1). Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизованных антител, обозначены как «без Ab».

Результаты выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции. Данные в таблице выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU) и представляют собой значения среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение (CO).

	без Ab		CA9hu-1_HC4LC4		CA9hu-2_HC4LC5	
	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO
8-MG-BA	6504,8 (100%)	3061,6	25128,0 (386,30%)	11827,8	27920,3 (429,23%)	2722,4
42-MG-BA	6537,5 (100%)	368,2	20258,5 (309,88%)	2110,8	6293,8 (96,27%)	303,7
BT-20	1628,0 (100%)	171,0	41048,3 (2521,40%)	2120,6	3296,3 (202,48%)	780,9
JIMT-1	2581,3 (100%)	111,5	5884,0 (227,94%)	213,0	2699,7 (104,58%)	164,3

Репортерный анализ ADCC позволил проанализировать более раннюю точку пути ADCC через NFAT-опосредованную активацию транскрипции генов в эффекторных клетках. В таблице 8 четко показано, что выбранные гуманизированные варианты антител CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5 сохраняют способность активировать путь ADCC и опосредовать цитотоксическое действие на клетки-мишени, экспрессирующие CA IX. По сравнению с отсутствием обработки Ab, репортерная активность ADCC повышалась после инкубации раковых клеток с вариантами антител CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5. Наибольшая индукция (выше 25-кратной) наблюдалась в клетках ТНРМЖ BT-20 после обработки антителом CA9hu-1\_HC4LC4.

## CDC

Для оценки способности гуманизированных вариантов антител участвовать в CDC применяли набор для анализа жизнеспособности Cell Titer Blue (Promega). Анализ жизнеспособности Cell Titer Blue обеспечивает гомогенный флуориметрический способ оценки количества жизнеспособных клеток с помощью индикаторного красителя резазурина и, таким образом, измерение метаболической способности клеток в качестве индикатора их жизнеспособности. В жизнеспособной клетке резазурин восстанавливается до высокофлуоресцентного резорурфина, генерирующего флуоресцентный сигнал, который

может быть измерен ( $530_{\text{Ex}}/590_{\text{Em}}$ ). Таким образом, флуоресцентный сигнал от реагента Cell Titer Blue пропорционален количеству жизнеспособных клеток.

Анализ Cell Titer Blue проводили в соответствии с инструкциями производителя с применением C-33a\_CA IX, а также C-33a\_нео клеток. Оба типа клеток (200 000 клеток/лунку) высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37 °С. Гуманизированные варианты антител, разбавленные до 5 мкг/мл, добавляли к обеим клеточным линиям. В каждую лунку добавляли сыворотку комплемента кролика (10% от общего объема, BAG Health Care, Lich, Германия), перемешивали и инкубировали. Жизнеспособность клеток количественно определяли и анализировали через 24 ч. Результаты выражены в виде флуоресценции, измеренной при  $530_{\text{Ex}}/590_{\text{Em}}$ .

Таблица 9: Влияние выбранных гуманизированных антител (CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5) на жизнеспособность анализируемых клеток +/-, экспрессирующих CA IX (C-33a\_CA IX по сравнению с C-33a\_нео), в присутствии комплемента, определенное с помощью анализа жизнеспособности Cell Titer Blue. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как «без Ab». Данные в таблице выражены в виде флуоресценции и представляют собой значения среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение (CO).

	C-33a_CA IX		C-33a_нео	
	Среднее	CO	Среднее	CO
без Ab	3393,5 (100%)	389,6	3096,5 (100%)	289,2
CA9hu-1_HC4LC4	1569,5 (46,25%)	205,8	2931 (94,66%)	103,2
CA9hu-2_HC4LC5	2159 (63,62%)	240,4	2807 (90,65%)	193,7

В таблице 9 иллюстрируется способность гуманизированных вариантов антител CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5 влиять на жизнеспособность CA IX-экспрессирующих клеток в присутствии комплемента. После 24-часовой инкубации с вариантами CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5 в присутствии комплемента, клетки C-33a\_CA IX показали только 46% и 64% жизнеспособности, соответственно. На жизнеспособность клеток C-33a\_нео почти не оказывалось влияния.

Вышеприведенные результаты демонстрируют, что гуманизированные варианты антител CA9hu-1 и CA9hu-2 могут быть применены для специфического разделения и, следовательно, опосредования цитотоксического ответа посредством ADCC или CDC на опухолевые клетки, экспрессирующие CA IX.

Пример 5: Влияния ADCC гуманизированных антител, опосредованных мононуклеарными клетками периферической крови, в трёхмерных сфероидах

Этот пример демонстрирует желательное свойство гуманизированных антител опосредовать активность ADCC в трёхмерных культурах.

Трёхмерные (3D) культуры, такие как многоклеточные сфероиды, все чаще применяются в фундаментальных исследованиях для изучения клеточной биологии и физиологии в более реалистичных условиях. Для подтверждения эффективности гуманизированных антител в опосредовании цитотоксического эффекта на раковые клетки в 3D системе авторы настоящего изобретения осуществили совместную культивацию клеток ТНPMЖ BT-20 и мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). МКПК выделяли из периферической крови человека (здорового донора) центрифугированием в градиенте плотности с помощью Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Для визуализации МКПК в сфероидах выделенные клетки окрашивали Оранжевым красителем для мечения цитоплазматической мембраны CellBrite (Biotium, Hayward CA, США). Сначала клетки BT-20 окрашивали Зеленым красителем для мечения цитоплазматической мембраны CellBrite, а затем предварительно формировали сфероиды BT-20 из 10 000 клеток на 25 мкл культуральной среды в каплях, подвешенных на крышке чашки для культивирования тканей в течение 7 дней при 37 °C. Через 10 дней культивирования предварительно окрашенные МКПК/Оранжевый клетки (2 000 000) добавляли вместе с сорока сфероидами BT-20 в чашки Петри и смешивали с гуманизированными антителами (CA9hu-1\_HC4LC4 или CA9hu-2\_HC4LC5; 25 мкг/мл). Сфероиды, культивируемые без гуманизированных антител, обрабатывали PBS (отрицательный контроль). Распределение предварительно окрашенных клеток МКПК в сфероидах анализировали после 3 дней обработки с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM510 Meta.

Для проверки эффекта длительного (11 дней) совместного культивирования с клетками МКПК, сфероиды BT-20 собирали и фиксировали в фиксирующем растворе



Карнуа в течение 2 ч и заливали в парафин в соответствии со стандартными гистологическими процедурами. Блоки сфероидов разрезали на 4 мкм тонкие срезы и подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью DAKO Cytomation EnVision+ System-HRP (DAB; DAKO, Glostrup, Дания) в соответствии с рекомендацией производителя. Первичное антитело, специфичное к мышечному моноклональному M75 к СА IX, разбавляли (1 мкг/мл) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Окрашивание визуализировали раствором DAB. В конце, срезы контрастировали гематоксилином Майера. Окрашенные срезы исследовали с помощью микроскопа LeicaDM4500B и фотографировали с помощью камеры Leica DFC480.

На фигуре 4 четко показано включение предварительно окрашенных МКПК в сфероиды BT-20. Визуализация с помощью конфокальной микроскопии выявила более интенсивное включение МКПК после обработки гуманизированными антителами CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5. Процент положительного сигнала от МКПК оценивали для всего сфероида BT-20 с помощью программного обеспечения ImageJ 1.38x (Rasband, W.S., ImageJ, NIH, Bethesda MD, США). Доля пикселей, окрашенных МКПК, во всем сфероиде составила 3,811% и 6,624% после обработки CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5, соответственно. В случае необработанных сфероидов было выявлено только 2,781% МКПК-положительных пикселей. Эффект длительной обработки сфероидов BT-20 МКПК и гуманизированными антителами исследовали через 11 дней. Как показано на Фигуре 4, значительные морфологические изменения наблюдались после совместного культивирования сфероидов BT-20 с МКПК человека и обработки гуманизированными антителами. Иммуногистохимический анализ применяли для визуализации экспрессии СА IX в сфероидах BT-20.

Вышеприведенные результаты демонстрируют, что гуманизированные антитела CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5 по изобретению способствуют ответу ADCC в 3D культурах сфероидов.

#### Пример 6: Влияние гуманизированных антител на жизнеспособность клеток

Этот пример демонстрирует желательное свойство гуманизированных антител не влиять на жизнеспособность клеток.

Для оценки влияния гуманизированных антител на жизнеспособность клеток анализ жизнеспособности Cell Titer Blue проводили аналогично анализу в Примере 4 (в отсутствие комплемента) и в соответствии с инструкциями производителя с применением C-33a\_CA IX, а также C-33a\_neo клеток. Оба типа клеток (200 000 клеток/лунку) высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37 °C. К обеим клеточным линиям добавляли гуманизированные варианты антител (CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5), разбавленные до 5 мкг/мл. Жизнеспособность клеток измеряли через 24 ч. Флуоресцентный сигнал от реагента Cell Titer Blue пропорционален количеству жизнеспособных клеток.

Таблица 10: Влияние выбранных гуманизированных антител (CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5) на жизнеспособность анализируемых клеток +/-, экспрессирующих CA IX (C-33a\_CA IX по сравнению с C-33a\_neo), определенное с помощью анализа жизнеспособности Cell Titer Blue. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как «без Ab». Данные в таблице выражены в виде флуоресценции и представляют собой значения среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение (CO).

	C-33a_CA IX		C-33a_neo	
	Среднее	CO	Среднее	CO
без Ab	7398 (100%)	192,3	7594,5 (100%)	34,6
CA9hu-1_HC4LC4	7819,5 (105,7%)	569,2	7512,5 (98,9%)	368,4
CA9hu-2_HC4LC5	7842 (106%)	291,3	8263 (108,8%)	718,4

Как показано в таблице 10, анализ жизнеспособности Cell Titer Blue показал, что жизнеспособность обработанных клеток C-33a, ни CA IX-положительных, ни CA IX-отрицательных, не изменилась через 24 ч.

Вышеприведенные данные демонстрируют, что гуманизированные варианты антител по изобретению, CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5, не оказывают токсического влияния на обработанные раковые клетки.

Пример 7: Прогнозирование безопасности гуманизированных антител с помощью анализа высвобождения цитокинов («цитокиновый шторм»)

Этот пример демонстрирует желательное свойство выбранных гуманизированных вариантов антител в анализе высвобождения цитокинов *in vitro*.

Анализ высвобождения цитокинов (CRA) лучше всего применять для идентификации опасности, но не для количественной оценки риска, и они могут помочь понять потенциальный риск и проинформировать о стратегиях снижения риска (Vidal et al, Cytokine 51: 213-215, 2010). CRA могут быть использованы для классификации терапий посредством прогнозируемой безопасности и могут предоставить дополнительные данные о потенциальных механизмах высвобождения цитокинов у человека. Лекарственные средства, нацеленные на мембранно-связанные антигены или рецепторы, несут больший риск индуцирования высвобождения цитокинов, чем лекарственные средства, нацеленные на растворимые молекулы. Измерение высвобождения цитокинов проводят в сравнении с лекарственными соединениями, которые, как известно, вызывают высокие и низкие ответы, в качестве контроля. Результаты анализа могут применяться для идентификации опасностей и оценки относительного риска. Для полного профиля цитокинового ответа измеряли следующие цитокины: интерлейкин (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, интерферон  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Suntharalingam et al, N Engl J Med 355(10): 1018-1028, 2006).

Для оценки высвобождения цитокинов, связанных с гуманизированными антителами по изобретению, проводили CRA (ProImmune Ltd., Oxford, Великобритания) и анализировали свежие образцы цельной крови 20 здоровых доноров. Неразбавленные образцы цельной крови инкубировали в присутствии тестируемых антител в различных концентрациях (100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл) при 37 °C в течение 24 ч. Измерение высвобождения цитокинов проводили с помощью микроматричного анализа ProArray Ultra®. Все цитокины количественно определяли по стандартной кривой известных концентраций. Два контрольных антитела (Erbitux®/цетуксимаб в качестве контроля с низким ответом и Campath®/алемтузумаб в качестве контроля с высоким ответом) также были включены в CRA. PBS применяли в качестве отрицательного контроля анализа. Положительный контроль анализа стафилококкового энтеротоксина В (SEB) применили для того, чтобы вызвать повышенное высвобождение цитокинов у всех доноров и, таким образом, для подтверждения, что анализ выполнен в соответствии с ожиданиями.

В таблице 11 представлены результаты анализа высвобождения цитокинов с медианными значениями (пг/мл) для каждой комбинации лекарственное средство/доза. Медианный ответ на SEB для всех цитокинов был выше нуля, демонстрируя, что донорские клетки обладают функциональной способностью продуцировать цитокины. В то время как Erbitux® вызывал в целом низкие уровни высвобождения цитокинов, применение Campath® приводило к повышенным уровням высвобождения IL-6, IL-8 и IFN $\gamma$  у большинства доноров (клинически это лекарственное средство связано с синдромом высвобождения цитокинов). Аналогично, как и в случае с Erbitux, гуманизированный вариант антитела CA9hu-1\_HC4LC4 не оказывал влияния на высвобождение тестируемых цитокинов, что указывает на полезное свойство данного конкретного гуманизованного варианта. С другой стороны, повышенные уровни IL-6 и IL-8 наблюдались для CA9hu-2\_HC4LC5, хотя только в двух самых высоких концентрациях. Этот результат указывает на повышенный цитокиновый ответ для CA9hu-2\_HC4LC5, и, таким образом, следует рассмотреть дозировку, а также соответствующее применение антитела по настоящему изобретению.

Таблица 11: Реакционная способность CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5 в анализе высвобождения цитокинов. Также были включены и проанализированы два контрольных антитела (Erbitux® в качестве контроля с низким ответом и Campath® в качестве контроля с высоким ответом). PBS применяли в качестве отрицательного контроля анализа, а стафилококковый энтеротоксин В (SEB) – в качестве положительного контроля. Результаты выражены в виде медианных уровней цитокинов (пг/мл) для каждой комбинации лекарственное средство/доза.

		IL-2 (пг/мл)	IL-4 (пг/мл)	IL-6 (пг/мл)	IL-8 (пг/мл)	IL-10 (пг/мл)	IFN $\gamma$ (пг/мл)	TNF $\alpha$ (пг/мл)
PBS		0	0	0	0	0	0	0
SEB		38106,5	59,7	26016,9	4632,5	442,0	37354,4	3609,9
CA9hu- 1_HC4LC4 (мкг/мл)	100	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0
	1	1,4	0	0	0	0	0	0
	0,1	7,0	0	0	0	0	0	0
CA9hu- 2_HC4LC5 (мкг/мл)	100	0	0	4594,3	51,5	4,8	0	0
	10	0	0	508,6	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0

	0,1	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0
Erbitux®	10	0	0	4,6	2,9	0	0	0
(мкг/мл)	1	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	3307,4	93,1	0	753,3	0
Campath®	10	0	0	1728,9	38,8	0	1642,9	0
(мкг/мл)	1	0	0	1733,5	82,3	0	2806,9	36,8
	0,1	0	0	851,1	37,4	0	1800,1	0

Информация о высвобождении цитокинов, полученная в данном анализе, не может рассматриваться как прогнозирующая клинические исходы. Полученные здесь данные должны быть частью более широкой стратегии идентификации опасности и должны рассматриваться в контексте всей другой известной или доступной информации об исследуемых соединениях.

Вышеприведенные результаты демонстрируют желательное свойство гуманизированных вариантов антител CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5 не индуцировать цитокиновый ответ (или очень незначительно в самых высоких концентрациях в случае CA9hu-2).

#### Пример 8: Интернализация гуманизированных антител CA9hu-1

Этот пример демонстрирует желательное свойство гуманизированных вариантов CA9hu-1 индуцировать интернализацию, что представляет собой эффективный инструмент иммунотерапии рака.

Эффективное применение моноклональных антител в терапии рака зависит от их способности специфически нацеливаться на раковые ткани и входить во внутриклеточное пространство посредством рецептор-опосредованной интернализации. Из двух мышиных моноклональных антител только mAb VII/20, направленное на каталитический домен CA IX, может вызывать опосредованный антителами эндоцитоз.

Чтобы исследовать способность гуманизированных антител по изобретению

индуцировать интернализацию, проводили проточную цитометрию. Клетки ТНРМЖ, JIMT-1, а также BT-20 (500 000 клеток/60-мм чашки Петри) инкубировали 48 ч в условиях гипоксии, чтобы индуцировать наивысший уровень экспрессии белка СА IX. Затем клетки инкубировали с гуманизированным вариантом антитела CA9hu-1\_HC4LC4 (25 мкг/мл; обозначены как «обработанные клетки») в течение 30 мин при 4 °С для рекрутирования комплексов CA9hu-1-СА IX на поверхности клетки. Для удаления несвязанного антитела клетки промывали и затем переносили на 3 ч в 37 °С, чтобы обеспечить интернализацию. В конце периода интернализации клетки трипсинизировали, переносили в пробирки и инкубировали с мышинным моноклональным антителом M75 (1 мкг/мл), направленным на СА IX, в течение 10 мин при комнатной температуре. Для определения количества экспрессии белка СА IX на клеточной поверхности клетки ТНРМЖ (обозначенные как «необработанные клетки») инкубировали с антителом M75 (аналогично, как и в случае обработанных клеток). В заключение, как обработанные, так и необработанные клетки инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с Alexa 488 (разбавленным 1 : 1000; ThermoFisher Scientific), в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии.

Таблица 12: Анализ истощения СА IX с поверхности клеток ТНРМЖ (BT-20 и JIMT-1), обработанных гуманизированным вариантом антитела CA9hu-1\_HC4LC4. Клетки ТНРМЖ, инкубированные в отсутствие гуманизированного антитела (обозначенные как «необработанные клетки»), служили для количественного определения СА IX клеточной поверхности для каждой линии раковых клеток. Результаты выражены в виде медианного уровня сигнала окрашивания СА IX, определенного с помощью проточной цитометрии.

		BT-20	JIMT-1
CA9hu-1_HC4LC4	необработанные клетки	107,59 (100%)	86,77 (100%)
	необработанные клетки	34,84 (32,38%)	38,61 (44,49%)

В таблице 12 показано истощение СА IX с поверхности клетки после обработки гуманизированным вариантом CA9hu-1\_HC4LC4 клеток BT-20, а также раковых клеток JIMT-1. Необработанные клетки, инкубированные только в присутствии неконкурентоспособного моноклонального антитела M75, применяли для количественного определения экспрессии белка СА IX на поверхности раковых клеток (обозначено в таблице как «100%»). По сравнению с необработанными клетками, уровень экспрессии СА IX на клеточной поверхности снижался после обработки гуманизированным антителом по

изобретению до 32,38% в ВТ-20 и 44,49% в клетках ЛМТ-1. Процент интернализированного СА IX составлял почти 68% в клетках ВТ-20 и 55,5% в клетках ЛМТ-1, соответственно.

Вышеприведенные данные демонстрируют, что гуманизированный вариант антитела СА9hu-1\_НC4LC4 сохраняет способность индуцировать интернализацию и доказывает тот факт, что гуманизация не повлияла на это желательное свойство.

#### Пример 9: Влияния гуманизированных антител на многоклеточную агрегацию

Этот пример демонстрирует исключительные свойства гуманизированных вариантов антител ингибировать многоклеточную агрегацию в условиях отсоединения.

Для подтверждения влияния гуманизированных антител по изобретению на способность обрабатываемых клеток образовывать многоклеточные агрегаты, был осуществлен многоклеточный анализ агрегации. Неионную кислоту поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (ПГЭМА; Sigma-Aldrich), которая ингибирует осаждение матрицы и присоединение клеток, растворяли в 99% этаноле при концентрации 10 мг/мл. 6-луночные планшеты для тканевых культур покрывали 0,5 мл раствора ПГЭМА, оставляли высыхать, промывали PBS и хранили при 4 °C. Клетки C-33a\_СА IX (400 000 клеток/лунку) добавляли в лунки, покрытые ПГЭМА, и культивировали в присутствии или в отсутствие гуманизированных вариантов антител СА9hu-1\_НC4LC4 или СА9hu-2\_НC4LC5 (30 мкг/мл) в течение 24 и 72 ч. Для оценки способности клеток C-33a\_СА IX образовывать многоклеточные агрегаты получали изображения обработанных и необработанных клеток и измеряли накопленную плотность пикселей с помощью программного обеспечения ImageJ. В конце более длительной обработки (72 ч) клетки C-33a\_СА IX выделяли, центрифугировали и затем анализировали с помощью проточной цитометрии с применением йодида пропидия для окрашивания мертвых клеток.

Многоклеточная агрегация раковых клеток во время отсоединения внеклеточного матрикса (ЕСМ) представляет собой эффективный механизм ингибирования апоптоза. На Фигуре 5 четко продемонстрировано, что гуманизированные варианты антител по изобретению ингибируют способность клеток C-33a\_СА IX образовывать многоклеточные агрегаты в условиях отсоединения на покрытых ПГЭМА чашках. При исследовании накопленной плотности пикселей многоклеточных агрегатов наблюдалось снижение почти

на 56% через 72 ч обработки антителом CA9hu-2\_HC4LC5. Обработка антителом CA9hu-1\_HC4LC4 кажется менее эффективной (снижение почти на 13% по сравнению с необработанными клетками), но точно так же, как и в случае CA9hu-2\_HC4LC5, оно наблюдалось через 24, а также 72 часа.

Для подтверждения повышенной чувствительности клеток C-33a\_CA IX к аноикису после обработки гуманизированными антителами, проводили проточную цитометрию и окрашивание йодидом пропидия.

На Фигуре 6 показано, что оба варианта антител по изобретению, CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5, влияют на жизнеспособность обработанных клеток C-33a\_CA IX через 72 ч в условиях отсоединения. Процент мертвых клеток, обработанных CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5, составил 37,3% и 35,1%, соответственно. Только 15,7% мертвых клеток наблюдались в случае клеток C-33a\_CA IX без обработки антителами («отрицательный контроль»).

Вышеприведенные данные демонстрируют способность гуманизированных антител по изобретению ингибировать многоклеточную агрегацию экспрессирующих CA IX раковых клеток C-33a (в условиях отсоединения) и впоследствии повышать их чувствительность к аноикису. Этот механизм действий представляет собой исключительно полезное свойство. Кроме того, оба гуманизированных варианта антител, CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5, снижали жизнеспособность обработанных клеток, а процент мертвых клеток, культивируемых в присутствии гуманизированных антител, был выше по сравнению с контрольными клетками.

Пример 10: Влияние гуманизированных антител на протеом/секретом, а также транскриптом пораженных клеток

Этот пример демонстрирует неожиданные свойства гуманизированных антител по изобретению влиять на цитокиновый профиль, а также экспрессию белков, ответственных за уклонение от противоопухолевого иммунитета.

Влияние гуманизированных вариантов антител на цитокиновый профиль *in vitro* анализировали с помощью цитокинового анализа Proteome Profiler Array (PPA; R&D Systems,



Inc.). PPA является быстрым, чувствительным и экономическим инструментом для одновременного обнаружения различий в цитокинах между образцами на нитроцеллюлозных мембранах. Цитокиновый анализ PPA проводили в соответствии с инструкциями производителя с применением клеточной линии ТНРМЖ ВТ-20, инкубированной в условиях гипоксии в течение 72 ч. Клетки ВТ-20 высевали на 12-луночный планшет (200 000 клеток/лунку) и инкубировали в присутствии или в отсутствие гуманизированных антител CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5 (50 мкг/мл). Затем получали и анализировали клеточные лизаты (ВТ-20\_протеом), а также супернатанты клеточной культуры (ВТ-20\_секретом). Разбавленные образцы инкубировали с мембранами PPA в течение ночи, промывали (для удаления несвязанного материала) и инкубировали с коктейлем биотинилированных детектирующих антител. Затем применяли и разрабатывали стрептавидин-HRP (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой) и хемилюминесцентные детектирующие реагенты. Сигнал получали в каждой фиксированной области, соответствующей количеству связанного белка. Плотности пикселей на разработанных рентгеновских пленках собирали и анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ 1.38x. Определяли средний сигнал (плотность пикселей) пары повторяющихся областей, представляющих каждый образец, и затем из каждой области вычитали усредненный фоновый сигнал. Результаты выражены как кратность изменения после обработки антителом (таблица 13).

Таблица 13: Цитокиновый анализ Proteome Profiler VEGF и IL-8 в клеточных лизатах клеток ВТ-20 (ВТ-20\_протеом), а также культуральной среде клеток ВТ-20 (ВТ-20\_секретом) после обработки выбранными гуманизированными антителами (CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5) в течение 72 ч в гипоксических условиях. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как «без Ab». Результаты выражены как кратность изменения после обработки антителом.

	ВТ-20_протеом		ВТ-20_секретом	
	VEGF	IL-8	VEGF	IL-8
без Ab	1	1	1	1
CA9hu-1_HC4LC4	0,59	0,65	0,79	0,84
CA9hu-2_HC4LC5	0,83	0,59	0,86	0,68

Как и ожидалось, цитокиновый анализ Proteome Profiler выявил несколько по-разному

затронутых цитокинов (либо с повышающей, либо с понижающей регуляцией), экспрессируемых (BT-20\_протеом) или высвобождаемых (BT-20\_секретом). Обработка гуманизированными антителами CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5 приводила к слегка отличающемуся профилю экспрессии. Однако экспрессия IL-8 и VEGF последовательно подавлялась в случае секрета, а также протеома, после инкубации клеток BT-20 в присутствии гуманизированных антител (таблица 13).

Для подтверждения влияния гуманизированных антител на транскрипционный профиль обработанных клеток применяли количественную ПЦР в реальном времени с (кПЦР-РВ). Таким образом, количественно определяли и анализировали экспрессию генов, кодирующих белки, ответственные за уклонение от противоопухолевого иммунитета, с помощью клеточной линии ТНРМЖ BT-20. Клетки BT-20, предварительно сформированные в сфероиды, сначала подвергали воздействию химиотерапевтического лекарственного средства, доксорубина (DOX; Sigma-Aldrich) в концентрации 1 мкМ в течение 4 дней с последующей 3-х дневной культивацией без DOX. Обработку гуманизированными вариантами антител CA9hu-1\_HC4LC4 или CA9hu-2\_HC4LC5 (25 мкг/мл) проводили в течение всего периода времени (7 дней). При этом клетки BT-20 без предварительной обработки DOX подвергали воздействию гуманизированных антител в течение 7 дней. Тотальную РНК экстрагировали с помощью TRIzol (ThermoFisher Scientific), а затем транскрибировали с помощью набора для обратной транскрипции кДНК с высокой емкостью (Applied Biosystems, Foster City CA, США). Количественную ПЦР проводили на системе ПЦР в реальном времени StepOne (Applied Biosystems) с применением Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) и ген-специфичных праймеров для CD47 и лиганда программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1), а также праймеров для  $\beta$ -актина, которые служили в качестве внутреннего контроля. Праймеры были следующие: смысловой CD47: 5'-AGAAGGTGAAACGATCATCGAGC-3' (SEQ ID NO. 61) и антисмысловой CD47: 5'-СТСАТССАТАССАССГГАТСТ-3' (SEQ ID NO. 62); смысловой PD-L1: 5'-TGGCATTTGCTGAACGCATTT-3' (SEQ ID NO. 63) и антисмысловой PD-L1: 5'-AGTGCAGCCAGGTСТААТТГТ-3' (SEQ ID NO. 64); смысловой  $\beta$ -актина: 5'-ССААССГСАГААГАТГАСС-3' (SEQ ID NO. 65) и антисмысловой  $\beta$ -актина: 5'-GATCTTCATGAGTAGTCAGT-3' (SEQ ID NO. 66). Результаты выражены как кратность изменения после обработки антителом (таблица 14).

Таблица 14: Анализ кПЦР-РВ уровней экспрессии CD47 и PD-L1 после обработки

выбранными гуманизированными антителами (CA9hu-1\_HC4LC4 и CA9hu-2\_HC4LC5) в течение 7 дней. Доксорубин в качестве химиотерапевтического лекарственного средства либо добавляли (DOX+), либо не добавляли (DOX-) в течение первых четырех дней лечения. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как «без Ab». Результаты выражены как кратность изменения после обработки антителом.

	CD47		PD-L1	
	Среднее	CO	Среднее	CO
DOX-/без Ab	1	0,426	1	0,179
DOX-/CA9hu-1_HC4LC4	1,088	0,056	0,832	0,066
DOX-/CA9hu-2_HC4LC5	1,042	0,037	0,891	0,042
DOX+/без Ab	2,249	0,033	4,940	0,071
DOX+CA9hu-1_HC4LC4	2,093	0,063	4,850	0,077
DOX+CA9hu-2_HC4LC5	1,533	0,237	3,011	0,026

Как показано в таблице 14, анализ кПЦР-РВ тотальной РНК, выделенной из клеток BT-20, обработанных гуманизированными антителами в течение 7 дней, выявил снижение экспрессии CD47, а также PD-L1. Понижающая регуляция обеих мРНК была более очевидной в клетках BT-20, подвергшихся воздействию доксорубина (DOX+), и приводила к снижению экспрессии PD-L1 и CD47 почти на 40% и более чем на 30% после обработки гуманизированным антителом CA9hu-2\_HC4LC5, соответственно.

Вышеприведенные данные демонстрируют способность гуманизированных антител, CA9hu-1 и CA9hu-2, влиять на цитокиновый профиль раковых клеток. VEGF и IL-8 являются двумя мощными ангиогенными факторами, секретируемыми клетками рака молочной железы, которые способствуют созданию и расширению неоваскуляризации опухоли. Ангиогенез имеет решающее значение для прогрессирования опухоли, и проангиогенные молекулы, такие как VEGF и IL-8, были исследованы в качестве потенциальных мишеней для терапии рака. Учитывая тот факт, что лечение клеток ТНРМЖ гуманизированными антителами по изобретению обладает способностью индуцировать некоторые косвенные эффекты, например, подавление экспрессии VEGF и IL-8, авторы изобретения предполагают, что терапия, нацеленная на СА IX, может принести дополнительную терапевтическую пользу для пациентов.

Способность раковых клеток уклоняться от иммунной системы (как врожденные, так и адаптивные ответы) играет решающую роль в рецидиве и метастазировании рака. CD47 представляет собой белок клеточной поверхности, который взаимодействует с сигнальным регуляторным белком  $\alpha$  на макрофагах для блокирования фагоцитоза. Его экспрессия представляет собой основной механизм, опосредующий уклонение раковых клеток от врожденного иммунитета. PD-L1, также известный как CD274, представляет собой трансмембранный белок, обычно экспрессируемый на поверхности антигенпрезентирующих клеток и опухолевых клеток. PD-L1 специфически связывается со своим рецептором PD-1, который экспрессируется на поверхности иммунородственных лимфоцитов. Прекращение взаимодействия PD-L1/PD-1 приводит к активации, пролиферации, образованию цитокинов и элиминации раковых клеток. Следовательно, подавление экспрессии опухолевого PD-L1 и CD47 в подвергающихся химиотерапии раковых клетках, обработанных гуманизированными антителами по изобретению, может приводить к ингибированию роста раковых клеток и, более того, представлять собой неожиданное свойство гуманизированных антител по изобретению. Кроме того, координатное ингибирование экспрессии PD-L1 и CD47 в ответ на обработку гуманизированными антителами клеток BT-20, подвергшихся воздействию доксорубина, обеспечивает обоснование для объединения химиотерапии и антител к СА IX по изобретению для улучшения исхода у онкологических пациентов.

В заключение, было продемонстрировано, что гуманизированные антитела по изобретению сохраняют антигенсвязывающую специфичность и обладают эффекторными функциями (ADCC, CDC). Кроме того, желательную безопасность применения гуманизированных антител определяли с помощью анализа высвобождения цитокинов с применением свежих образцов цельной крови от 20 доноров. Были доказаны специфические свойства, например, интернализация гуманизированного варианта, происходящего из mAb VII/20, которая представляет собой эффективный инструмент для иммунотерапии рака. Что более важно, в анализе многоклеточной агрегации в условиях отсоединения и в анализе протеома, секретома и транскриптома обработанных раковых клеток с применением анализа Proteome Profiler и кПЦР-РВ были выявлены неожиданные и исключительные свойства гуманизированных антител.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, специфически распознающее СА IX человека, содержащее:

а) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

GFTFTDYMH (SEQ ID NO. 1) и

FIRNKASGYTPQYSASVKG (SEQ ID NO. 2) и

VRGGHAGSNYWYFDV (SEQ ID NO. 3), или

последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

GFTFNTNAMH (SEQ ID NO. 17) и

RIRSKSNNYTTYADSVKD (SEQ ID NO. 18) и

VCGSWFAY (SEQ ID NO. 19);

и

б) последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2:

HVSQNINWLS (SEQ ID NO. 9) и

QASNLHT (SEQ ID NO. 10) и

QQGQSYPT (SEQ ID NO. 11), или

последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

KSSQSLNSSNQKNYLA (SEQ ID NO. 25) и

FTSTRQS (SEQ ID NO. 26) и

QQHYSIPLT (SEQ ID NO. 27).

2. Гуманизированное антитело по п. 1, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные последовательностям GFTFTDYMH (SEQ ID NO. 1) и FIRNKASGYTPQYSASVKG (SEQ ID NO. 2) и VRGGHAGSNYWYFDV (SEQ ID NO. 3) или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или

отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты: HVSQNINVWLS (SEQ ID NO. 9) и QASNLHT (SEQ ID NO. 10) и QQGQSYPT (SEQ ID NO. 11).

3. Гуманизованное антитело по п. 1, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные последовательностям GFTFNTNAMH (SEQ ID NO. 17) и RIRSKSNNYTTYADSVKD (SEQ ID NO. 18) и VCGSWFAY (SEQ ID NO. 19) или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты, и последовательность варибельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты: KSSQSLNSSNQKNYLA (SEQ ID NO. 25) и FTSTRQS (SEQ ID NO. 26) и QQHYSIPLT (SEQ ID NO. 27).

4. Гуманизованное антитело по любому из пп. 1-3, содержащее по меньшей мере одну варибельную область, выбранную из группы, состоящей из:

- варибельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательность:

X<sup>1</sup>VX<sup>2</sup>LVX<sup>3</sup>SGGGLVQPGX<sup>4</sup>SLRLSCX<sup>5</sup>ASGFTFTDYMHVWRQAPGX<sup>6</sup>GLEWX<sup>7</sup>X<sup>8</sup>FIRN  
KASGYTPQYSASVKGRFTISRDX<sup>9</sup>X<sup>10</sup>X<sup>11</sup>X<sup>12</sup>X<sup>13</sup>X<sup>14</sup>YLQMNSLX<sup>15</sup>X<sup>16</sup>EDTAX<sup>17</sup>YYVRGGH  
AGSNYWYFDVWGX<sup>18</sup>GTX<sup>19</sup>VTVSS (SEQ ID NO. 33),

где

X<sup>1</sup> представляет собой E или Q

X<sup>2</sup> представляет собой Q или R

X<sup>3</sup> представляет собой E или Q

X<sup>4</sup> представляет собой G или R

X<sup>5</sup> представляет собой A или T

X<sup>6</sup> представляет собой K или R

X<sup>7</sup> представляет собой V или L

X<sup>8</sup> представляет собой A или G

X<sup>9</sup> представляет собой D или N

X<sup>10</sup> представляет собой S или A

X<sup>11</sup> представляет собой K или T или E

X<sup>12</sup> представляет собой N или T

X<sup>13</sup> представляет собой S или I

X<sup>14</sup> представляет собой L или A

X<sup>15</sup> представляет собой K или R

X<sup>16</sup> представляет собой T или A или I

X<sup>17</sup> представляет собой V или I

X<sup>18</sup> представляет собой Q или K

X<sup>19</sup> представляет собой T или L или M; и

- вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательность:

DIQMTQSPSX<sup>20</sup>LSASVGDRVITIX<sup>21</sup>CHVSONINVWLSWYQQKPGX<sup>22</sup>APX<sup>23</sup>LLIYQASNLH  
TGVPSRFSGSGSGTX<sup>24</sup>FTX<sup>25</sup>TIX<sup>26</sup>SLQPX<sup>27</sup>DX<sup>28</sup>X<sup>29</sup>TYYCQOGQSYPF<sup>28</sup>FGX<sup>30</sup>GTKX<sup>31</sup>EIK  
(SEQ ID NO. 34),

где

X<sup>20</sup> представляет собой S или T

X<sup>21</sup> представляет собой T или N

X<sup>22</sup> представляет собой K или N или E

X<sup>23</sup> представляет собой N или K

X<sup>24</sup> представляет собой H или E или D или G

X<sup>25</sup> представляет собой L или F

X<sup>26</sup> представляет собой S или G или R

X<sup>27</sup> представляет собой E или D

X<sup>28</sup> представляет собой I или F или Y

X<sup>29</sup> представляет собой A или V

X<sup>30</sup> представляет собой Q или G

X<sup>31</sup> представляет собой V или L; и

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательность:

X<sup>32</sup>VQLVESGGGX<sup>33</sup>VQPGX<sup>34</sup>SLX<sup>35</sup>LSCAASGFTFNTNAMHWVRQAX<sup>36</sup>GX<sup>37</sup>GLEWVX<sup>38</sup>  
RIRSKSNNYTTYADSVKDRFTISRDX<sup>39</sup>SKX<sup>40</sup>TX<sup>41</sup>YLQX<sup>42</sup>NSLX<sup>43</sup>X<sup>44</sup>EDTAVYYCVC  
WFAIWGQGTX<sup>45</sup>VTVSS (SEQ ID NO. 35),

где

X<sup>32</sup> представляет собой E или Q

X<sup>33</sup> представляет собой L или V

X<sup>34</sup> представляет собой G или R

X<sup>35</sup> представляет собой K или R

X<sup>36</sup> представляет собой S или P

X<sup>37</sup> представляет собой K или R

X<sup>38</sup> представляет собой A или G

X<sup>39</sup> представляет собой D или N

X<sup>40</sup> представляет собой N или S

X<sup>41</sup> представляет собой A или L

X<sup>42</sup> представляет собой M или V

X<sup>43</sup> представляет собой K или R

X<sup>44</sup> представляет собой T или A

X<sup>45</sup> представляет собой L или T; и

- вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательность:

DX<sup>46</sup>X<sup>47</sup>MTQSPDSLAVSLGERX<sup>48</sup>TINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWX<sup>49</sup>QQKPGQX<sup>50</sup>PX<sup>51</sup>X<sup>52</sup>X<sup>53</sup>IYFTSTRQSGVPDRFX<sup>54</sup>GSGSGTDFTLTIX<sup>55</sup>SLQAEDVAVYX<sup>56</sup>CQQHYIPLTFGQG  
TX<sup>57</sup>X<sup>58</sup>EIK (SEQ ID NO. 36),

X<sup>46</sup> представляет собой V или I

X<sup>47</sup> представляет собой V или Q

X<sup>48</sup> представляет собой V или A

X<sup>49</sup> представляет собой Y или F

X<sup>50</sup> представляет собой S или P

X<sup>51</sup> представляет собой K или N

X<sup>52</sup> представляет собой L или V

X<sup>53</sup> представляет собой L или V

X<sup>54</sup> представляет собой S или T

X<sup>55</sup> представляет собой S или N

X<sup>56</sup> представляет собой Y или F

X<sup>57</sup> представляет собой K или Q

X<sup>58</sup> представляет собой L или V.

5. Гуманизованное антитело по п. 4, содержащее области тяжелой цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO. 33, и области легкой цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO. 34.

6. Гуманизованное антитело по п. 4, содержащее области тяжелой цепи, имеющие последовательности SEQ ID NO. 35, и области легкой цепи, имеющие последовательности SEQ ID NO. 36.

7. Гуманизованное антитело по п. 4, содержащее по меньшей мере одну вариабельную область, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMHWVRQAPGKGLEWVAFIRNKASG  
YTPQYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKIEDTAVYYCVRGGHAGSNYWFYFDVW



GQGTTVTVSS (SEQ ID NO. 4),  
EVRLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWLGFIRNKASGY  
TPQYSASVKGRFTISRDDSTNSLYLQMNSLKTEDTAIYYCVRGGHAGSNYWYFDVWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO. 5),

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVGFFIRNKASG  
YTPQYSASVKGRFTISRDDSKTIAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRGGHAGSNYWYFDVW  
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO. 6),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGRGLEWVAFFIRNKASG  
YTPQYSASVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGGHAGSNYWYFDVW  
GKGTTVTVSS (SEQ ID NO. 7) и

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMHWVRQAPGKGLEWVGFFIRNKASG  
YTPQYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRGGHAGSNYWYFDVW  
GQGMVTVSS (SEQ ID NO. 8);

b) аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICHVSNINVWLSWYQQKPGKAPNLLIYQASNLHTGVP  
SRFSGSGSGTHFTLTISLQPEDATYYCQQGQSYPTFGGQGTKVEIK (SEQ ID NO. 12),

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICHVSNINVWLSWYQQKPGNAPKLLIYQASNLHTGVP  
SRFSGSGSGTEFTLTIGSLQPDFVTYYCQQGQSYPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO. 13),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICHVSNINVWLSWYQQKPGEAPKLLIYQASNLHTGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 14),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITINCHVSNINVWLSWYQQKPGEAPKLLIYQASNLHTGVP  
SRFSGSGSGTGFTLTIRSLQPEDYYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 15) и

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICHVSNINVWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASNLHTGVP  
SRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQGQSYPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 16);

c) аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVT  
VSS (SEQ ID NO. 20),

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVT  
VSS (SEQ ID NO. 21),

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGRGLEWVARIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDNSKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVT

VSS (SEQ ID NO. 22),

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVT

VSS (SEQ ID NO. 23) и

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGTTVT

VSS (SEQ ID NO. 24); и

d) аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

DVVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFTST  
RQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 28),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQKPGQPPNLVIYFTSTR  
QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTQVEIK (SEQ ID NO. 29),

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTR  
QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO. 30),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQKPGQPPKVLIIYFTSTR  
QSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 31) и

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTR  
QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 32).

8. Гуманизированное антитело по п. 7, содержащее в одном антителе по меньшей мере одну из варибельных областей тяжелой цепи, перечисленных в а), и по меньшей мере одну из варибельных областей легкой цепи, перечисленных в б).

9. Гуманизированное антитело по п. 7, содержащее в одном антителе по меньшей мере одну из варибельных областей тяжелой цепи, перечисленных в с), и по меньшей мере одну из варибельных областей легкой цепи, перечисленных в d).

10. Гуманизированное антитело по п. 7, где указанное гуманизированное антитело содержит:

- аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 7, и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, содержащую или имеющую

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15 и SEQ ID NO. 16;

или

- аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 22 и SEQ ID NO. 23, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 29 и SEQ ID NO. 32.

11. Гуманизированное антитело по п. 7, где указанное гуманизированное антитело содержит:

- аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 7, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 15; или

- аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 23, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 32.

12. Гуманизированное антитело по любому из пп. 1-11, которое имеет константные области тяжелых цепей IgG человека (аллотип G1m17,1) и константные области легких цепей каппа человека (аллотип Km3).

13. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела по любому из пп. 1-12, которое специфически распознает СА IX человека, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

14. Гуманизированное антитело или фармацевтическая композиция по п. 13, предназначенная для применения при лечении заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка СА IX, предпочтительно выбранного из клеточного пролиферативного заболевания или расстройства, более предпочтительно, указанное заболевание или расстройство представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака

предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рака головы и шеи.

15. Гуманизированное антитело или фармацевтическая композиция по п. 14, предназначенная для применения при лечении рака молочной железы, мезотелиомы или глиобластомы, экспрессирующих СА IX.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию терапевтически эффективных количеств гуманизированных антител по любому из пп. 1-12, которые специфически распознают СА IX человека, причем одно из гуманизированных антител вводят до или после введения второго гуманизированного антитела.

17. Способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка СА IX, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела или фармацевтической композиции по п. 13, предпочтительно выбранного из клеточного пролиферативного заболевания или расстройства, более предпочтительно указанное заболевание или расстройство представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рака головы и шеи.

18. Способ лечения рака молочной железы, мезотелиомы или глиобластомы, экспрессирующих СА IX, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела или фармацевтической композиции по п. 13.

19. Способ снижения или ингибирования инвазивности опухоли у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела или фармацевтической композиции по п. 13, тем самым снижая или ингибируя инвазивность опухоли у субъекта.

20. Способ по любому из пп. 13-19, включающий введение пациенту

подходящей суточной или еженедельной дозы гуманизованного антитела к СА IX, предпочтительно составляющей 0,001-15 мг/кг массы тела.

21. Способ по п. 20, включающий введение

- i) многократных, идентичных или различных доз гуманизованного антитела,
- ii) многократных возрастающих доз гуманизованного антитела, или
- iii) дозы гуманизованного антитела один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в 5 недель.

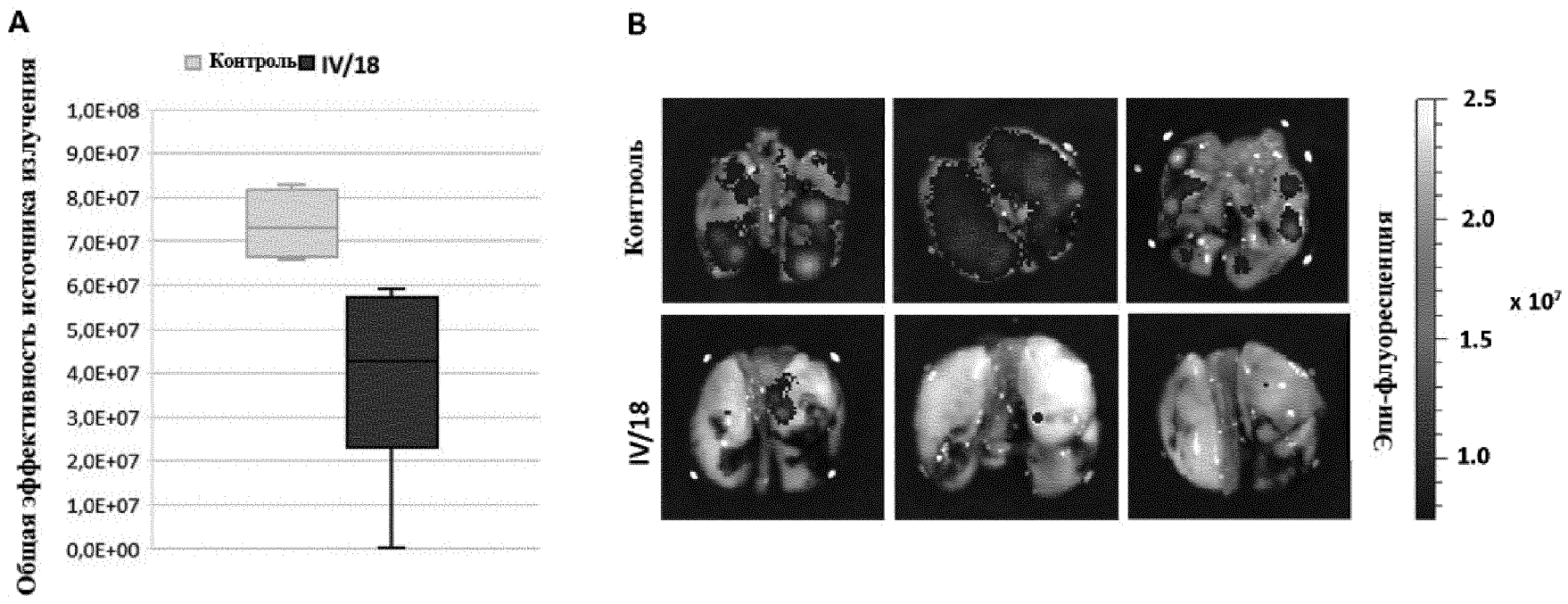
22. Способ по п. 17, включающий 1-10 циклов введения, причем каждый цикл включает 2-5 инфузий/доз с гуманизованным антителом каждые 1-4 недели с последующим перерывом в 1-8 недель между каждыми двумя циклами.

23. Диагностическая композиция, содержащая по меньшей мере одно гуманизованное антитело по любому из пп. 1-12 и по меньшей мере один носитель, разбавитель или эксципиент.

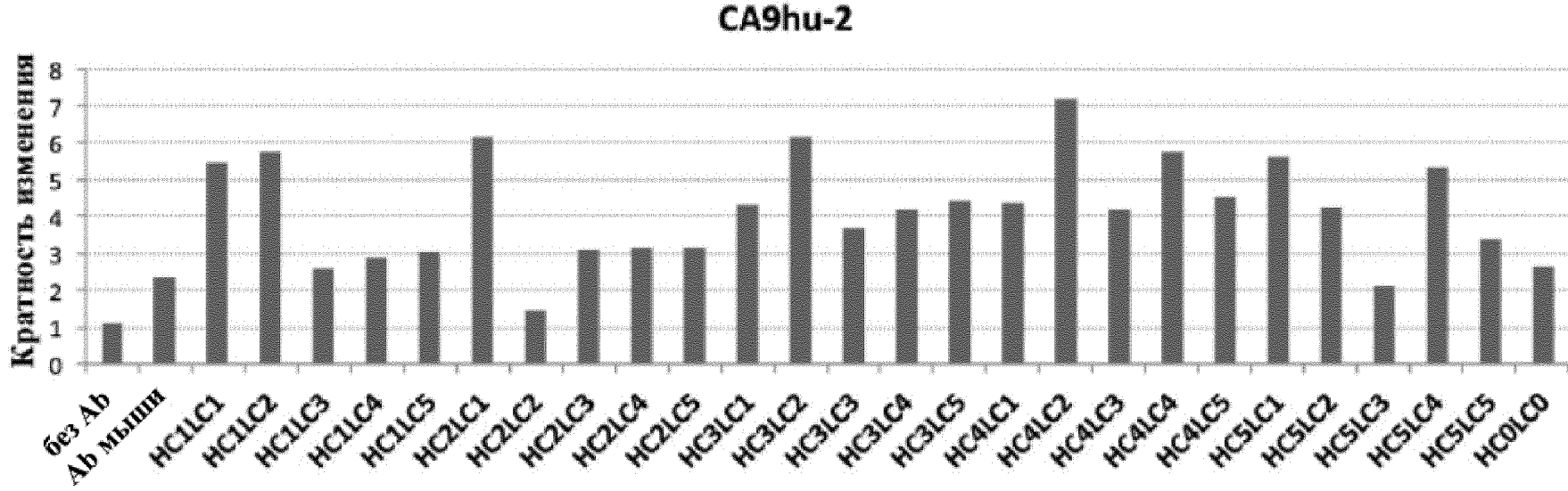
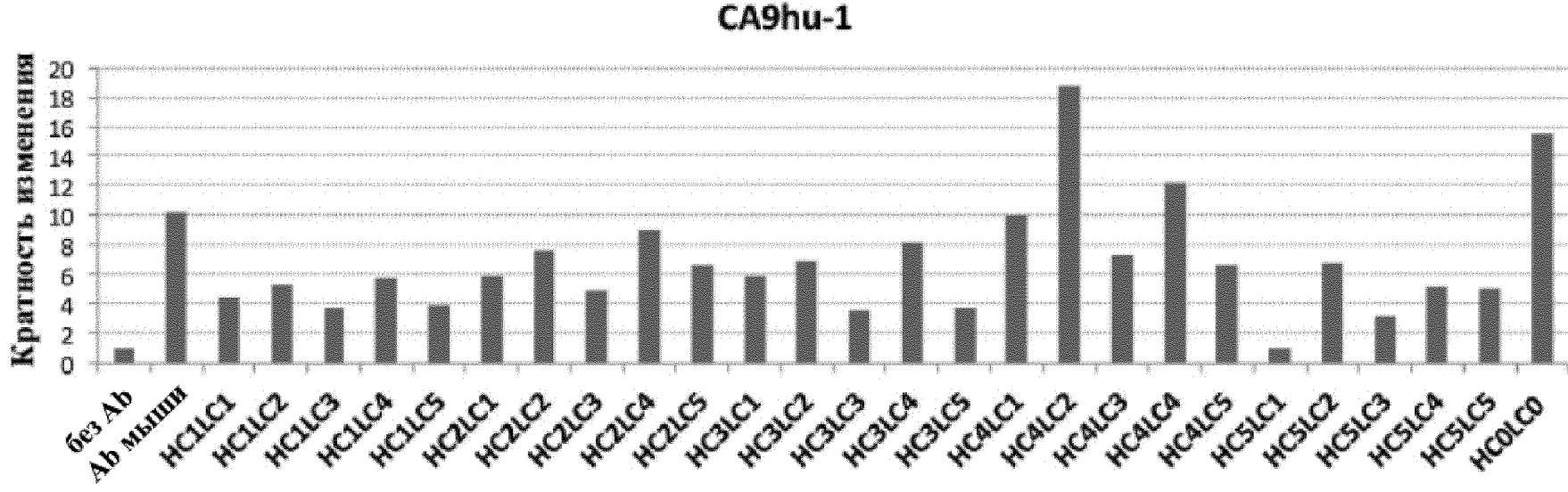
24. Способ диагностики рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий приведение в контакт биологического образца, происходящего из или полученного от указанного субъекта, с диагностической композицией по п. 23, при этом образование комплекса, превышающее заранее определенный порог, свидетельствует о наличии рака у указанного субъекта.

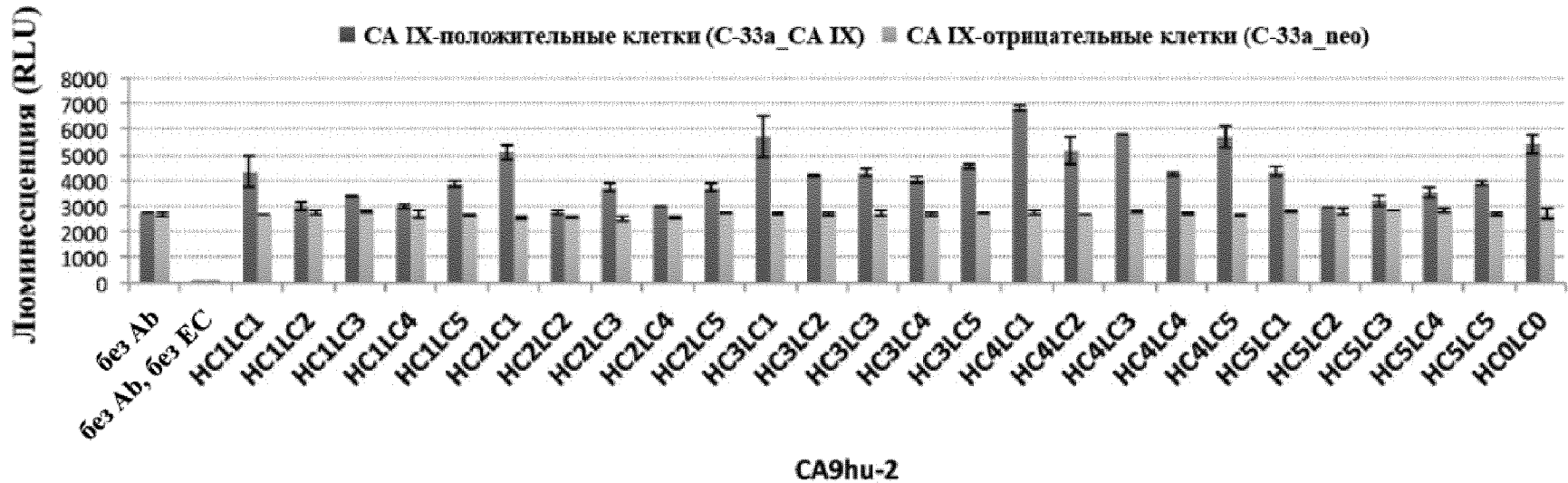
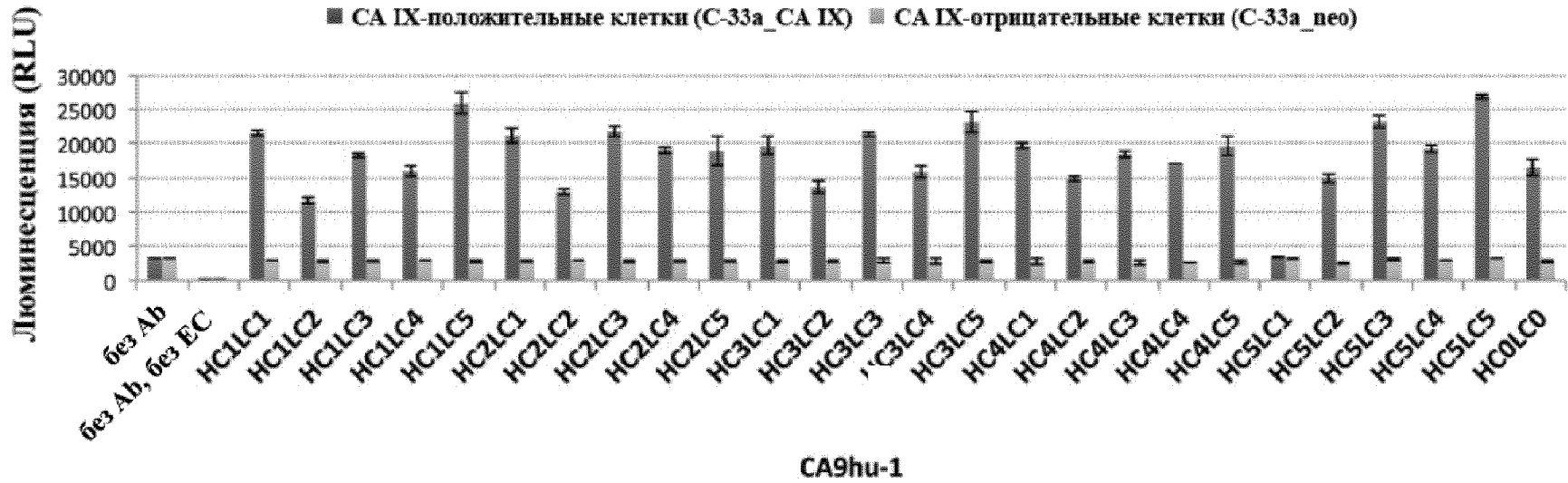
25. Способ диагностики рака у субъекта по п. 24, в котором гуманизованное антитело по любому из пп. 1-12 соединено, связано или конъюгировано с парамагнитным, радиоактивным или флуорогенным фрагментом, который может быть обнаружен при визуализации.

Фигура 1:



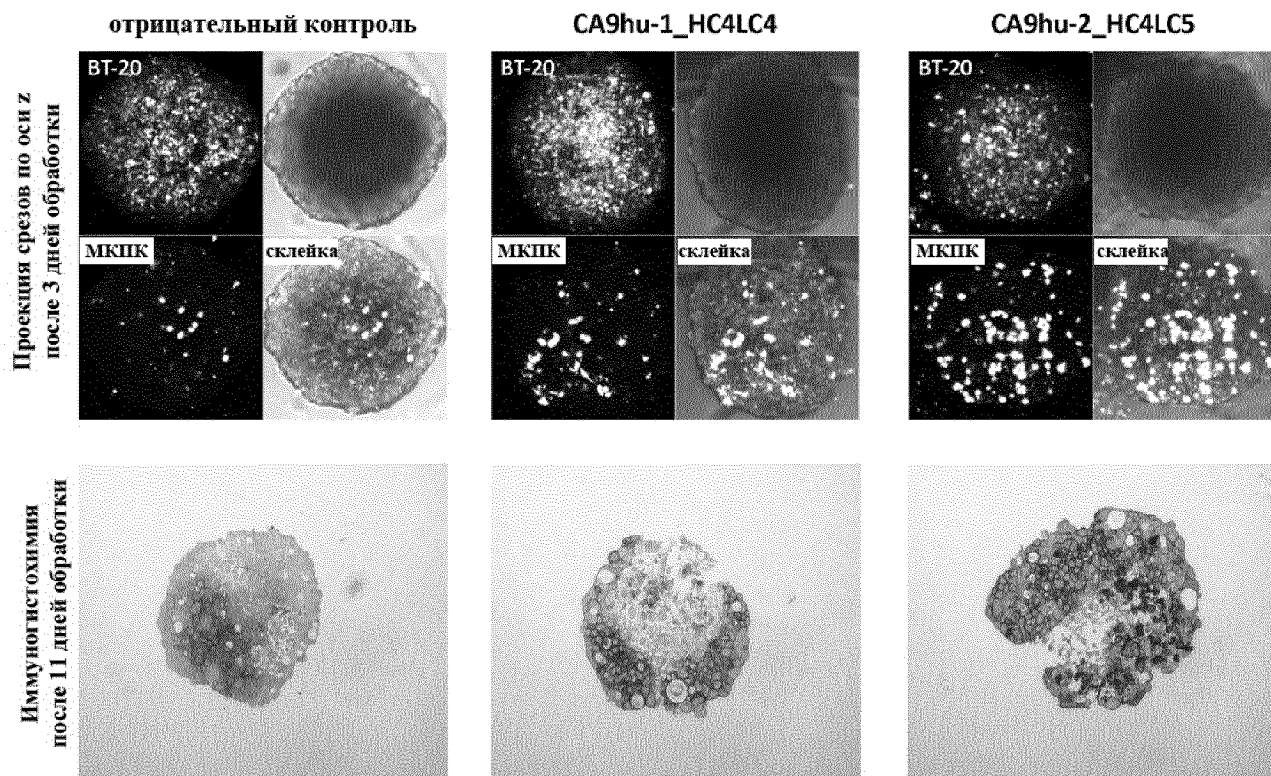
Фигура 2:



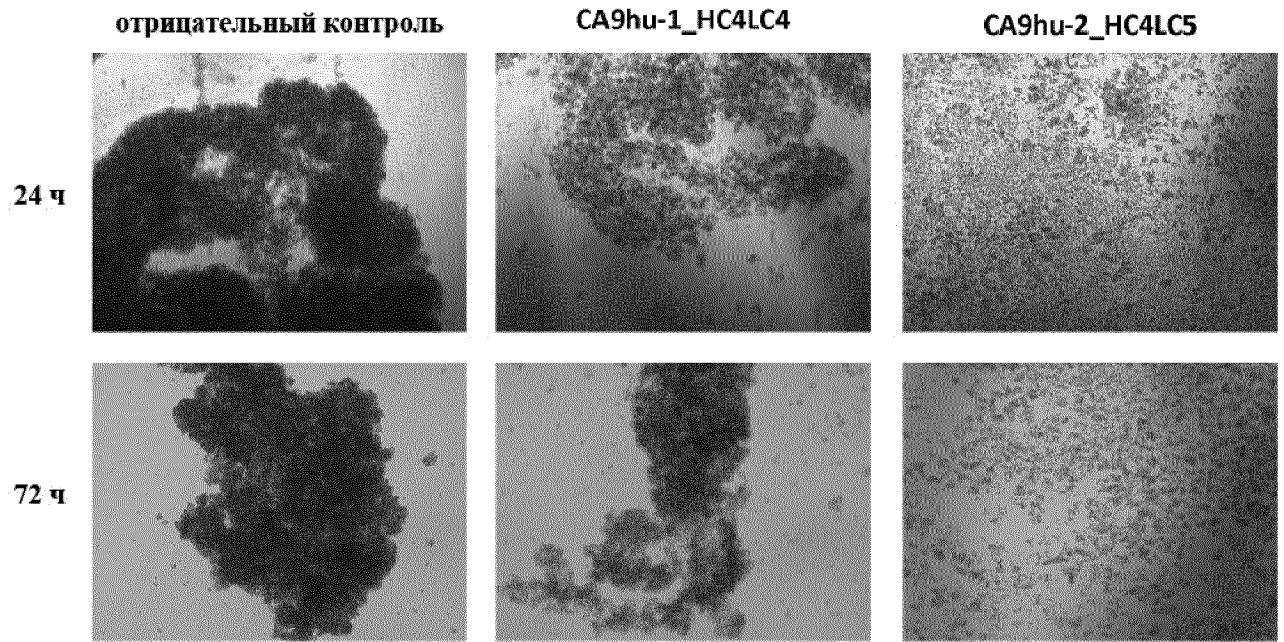




Фигура 4:



Фигура 5:



Фигура 6:

